



Università di Pisa
Facoltà di Agraria

Laurea Specialoistica in “Biotechnologie Alimentari”

Tesi di laurea

Qualità e sicurezza dei frutti di pomodoro ottenuti con piante
micorrizate.

CANDIDATA:
Ambra Iezzi

RELATORI:
Prof. Piero Picciarelli

Prof. Manuela Giovannetti

CORRELATORE:
Prof. Roberto Scarpato

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag.3
1.1 Micorrize arbuscolari	3
Tipi di micorrize	4
Sviluppo della simbiosi	7
Scambi metabolici	8
Batteri AM	10
1.2 Cambiamenti nella pianta indotti dalla micorrizzazione	11
Cambiamenti nelle radici	12
Cambiamenti nella parte aerea	14
Cambiamenti nel frutto	20
1.3 Qualità dei frutti	22
Sicurezza	22
Contenuto nutrizionale	27
Valutazione sensoriale	31
2. SCOPO DELLA TESI	34
3. MATERIALI E METODI	36
4. RISULTATI	43
5. DISCUSSIONE	73
BIBLIOGRAFIA	79

1. INTRODUZIONE

L'interesse sulla qualità degli alimenti e i suoi effetti sulla salute è cresciuto rapidamente negli ultimi anni.

L'opportunità di un valore aggiunto di un prodotto alimentare associato all'aumento del valore nutrizionale sta ponendo l'attenzione su questo argomento e anche i ricercatori che si occupano di suolo e coltivazione cominciano a interessarsi a come aumentare in modo economico il contenuto nutrizionale dei cibi.

E' stato dimostrato che gli input nutrizionali forniti alle coltivazioni influiscono sulla qualità e sui componenti funzionali dei prodotti alimentari che ne derivano (White e Broadley, 2005). In questo senso è importante porre l'attenzione su un aspetto della biofortificazione del cibo che è quello dell'uso delle micorrize. Molte piante, inclusi cereali e quasi tutti i vegetali e frutti commestibili, sono associate a funghi micorrizici che aumentano l'assorbimento di minerali essenziali dal terreno e aumentano la crescita, la produttività e la salute delle piante (Smith e Read, 1997). Fra le conseguenze, questi funghi simbiotici cambiano, direttamente o indirettamente, il contenuto nutrizionale dei prodotti delle piante. In questo senso le micorrize possono diventare un efficace, sostenibile ed economico strumento per aumentare la qualità degli alimenti (Xinhua e Kazuhide, 2007).

La ricerca nel campo delle micorrize arbuscolari ha fatto passi da gigante negli ultimi vent'anni. La maggior parte degli sforzi in questo senso sono stati diretti verso la comprensione dei meccanismi di questa simbiosi. Ma i cambiamenti fisiologici che avvengono nella parte aerea e nei frutti delle piante ospite è ancora piuttosto oscura (Toussaint, 2007).

1.1 Micorrize Arbuscolari

Le micorrize arbuscolari (AM) sono simbiosi tra piante e membri di un antico phylum di funghi, Glomeromycota, localizzate nell'ambito dell'apparato radicale.

La pianta riesce ad assorbire in modo più efficiente acqua e nutrienti grazie alle ife fungine che si estendono nel terreno e in cambio cede a queste una parte del carbonio fissato con la fotosintesi (Parniske, 2008). Inoltre la rete miceliare del

simbionte fungino mantiene aggregate le particelle del terreno influenzando positivamente la penetrazione dell'acqua e la stabilità del suolo (Giovannetti e Avio, 2002) e agiscono da bioprotettori contro patogeni e stress tossici (Jeffries et al, 2003).

I primi studi sulle micorrize furono condotti in Germania verso la fine dell'800 dal patologo forestale Albert Bernhard Frank. Osservando che il sistema radicale delle piante superiori era sempre avvolto da un intreccio ifale, intuì la natura simbiotica di questo legame e gli diede il nome di *mykorrhiza* (dal greco: *mykos*, fungo, e *rhiza*, radice) (Frank, 1885) .

Le micorrize sono distribuite ovunque, dalle regioni artiche alle sub-antartiche, dalle praterie alle foreste, dalle dune del deserto ai luoghi alpini (Giovannetti e Avio, 2002).

Le piante simbiotiche di micorrize appartengono praticamente a tutti i phyla: *Bryophyta*, quasi tutti i gruppi delle *Pteridophyta*, tutti i gruppi delle *Gymnospermae* e la maggior parte delle famiglie delle *Angiospermae*.

I funghi coinvolti nelle micorrize sono i più diffusi in natura, assenti solo negli habitat marini. Attualmente si conoscono circa 6.000 specie di funghi micorrizici, ma l'avvento delle tecniche molecolari dovrebbe aumentare questo numero.

Tipi di micorrize

Le simbiosi possono essere ectomicorrize, ectoendomicorrize ed endomicorrize.

Le prime interessano principalmente ascomiceti e basidiomiceti e la maggior parte delle angiosperme arboree e delle conifere, nelle quali è possibile osservare un mantello fungino esterno che avvolge gli apici radicali. Le ectomicorrize, comparse sulla terra probabilmente intorno a 150 milioni di anni fa, sono così definite perché le ife non penetrano mai all'interno delle cellule dell'ospite. Dal mantello le ife si ramificano tra le cellule della corteccia radicale formando un intreccio intercellulare.

Le ectoendomicorrize, che costituiscono una forma intermedia tra le ectomicorrize e le endomicorrize, rappresentano un tipo di micorriza ancora poco conosciuto e indagato. Esse interessano principalmente alcune conifere e sono

caratterizzate da un manicotto molto sottile o assente, e dal fatto che, soprattutto nelle parti più vecchie delle radici, le cellule vengono invase da matasse di ife. Le endomicorrize sono decisamente le simbiosi più diffuse e antiche. Sono stati ritrovati fossili di 400 milioni di anni fa (Remy et al., 1994; Dotzler et al., 2006). Tra le endomicorrize si distinguono le Ericoidi, tra piante della famiglia delle ericacee e funghi ascomiceti e basidiomiceti, le Rhizoctonia, micorrize delle orchidee, e le micorrize arbuscolari (AM), il tipo maggiormente rappresentato. Il nome arbuscolare è dovuto al fatto che il fungo forma nelle radici della pianta ospite strutture intracellulari molto ramificate chiamate arbuscoli. Le MA si riscontrano nell'80% delle specie vegetali, in particolare in quelle erbacee. Il livello di specificità delle AM generalmente è molto basso e spesso formano un reticolo ifale che interconnette diverse specie di piante fra loro.

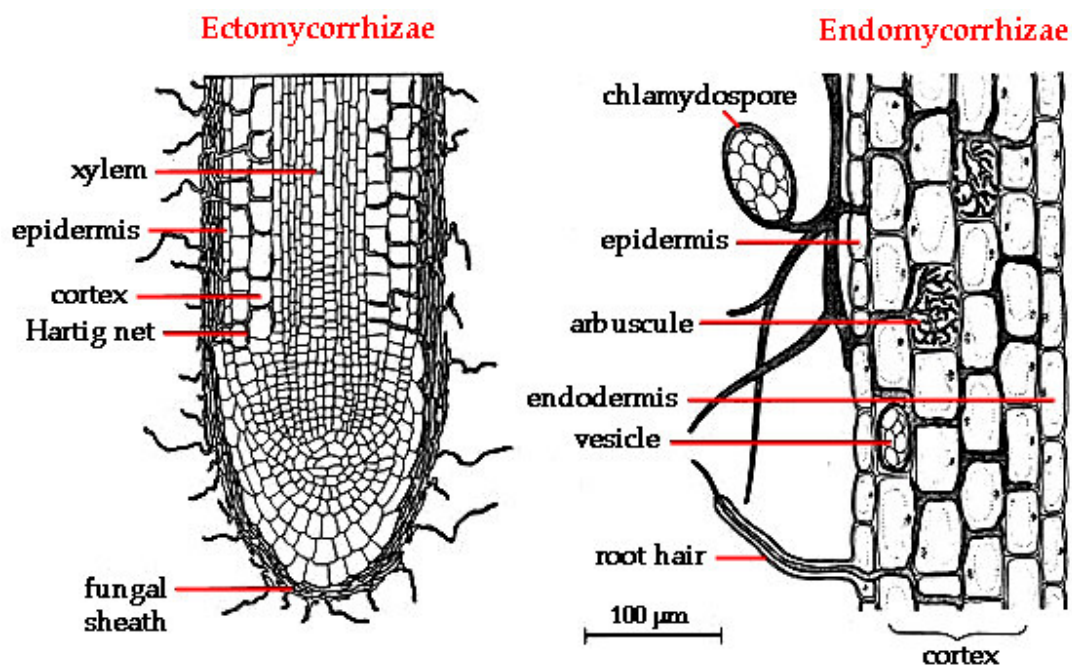


Fig. 1.1. Ectomicorriza ed endomicorriza.

I funghi che partecipano alle micorrize arbuscolari appartengono al phylum *Glomeromycota* (James et al. 2006, Hibbett et al. 2007).

Phylum Glomeromycota

Class Glomeromycetes

Orders	Families	Genera
1. Glomerales	Glomeraceae	<i>Glomus</i>
2. Diversisporales	Gigasporaceae	<i>Gigaspora</i> , <i>Scutellospora</i>
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i> , <i>Kuklospora</i>
	Entrophosporaceae	<i>Entrophospora</i>
	Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Diversisporaceae	<i>Diversispora</i>
3. Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>
4. Archaeosporales	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>
	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i> , <i>Intraspora</i>

Fig 1.2. Recente classificazione dei funghi micorrizici arbuscolari (Sieverding e Oehl, 2006).

La diversità dei funghi AM dipende dal tipo di ecosistema, dalle pratiche agricole e dallo stato del terreno. Helgason et al. (1998) trovò una grande varietà di funghi AM in un ecosistema forestale in confronto a un ecosistema agricolo. La lavorazione del terreno può ridurre la densità delle spore, l'estensione del micelio e la quantità di spore dei funghi AM mentre la non lavorazione del terreno stimola l'attività micorrizica (Dodd, 2000; Boddington e Dodd, 2000).

Le più importanti piante coltivate dei climi temperati e tropicali formano micorrize arbuscolari: cereali (incluso riso, mais, orzo e grano), molti legumi, molti alberi da frutto (limone, pesco, vite e olivo), molte orticole (tra cui aglio, pomodoro, carciofo, patata e fragola), e altre specie economicamente importanti come girasole, manioca, cotone, canna da zucchero, tabacco, caffè, tè, cacao e

banano. Fanno eccezione poche famiglie come *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae* e *Cyperaceae* (Smith e Read, 1997; Giovannetti e Avio, 2002).

Questi funghi non mostrano preferenze per specifici ospiti, e proprio questa assente o ridotta specificità è uno dei fattori che ne decreta il successo evolutivo (Logi et al., 1998).

Sviluppo della simbiosi

Tutti i funghi micorrizici arbuscolari hanno bisogno di un partner fotosintetico per completare il ciclo vitale.

I funghi micorrizici arbuscolari si riproducono asessualmente attraverso la produzione di spore nel suolo. Queste in condizioni adatte di temperatura, pH e umidità, germinano e danno origine a un micelio presimbiotico che può crescere fino a 50-200 mm ma che non è in grado di ulteriore sviluppo prima di aver stabilito una simbiosi. Il micelio presimbiotico è in grado di riconoscere alcuni segnali chimici provenienti dalle radici dell'ospite che lo attraggono e ne stimolano la ramificazione. La natura chimica dei segnali chimici non è ancora stata chiarita ma sembrano coinvolti composti fenolici e lattoni.

La tappa successiva al riconoscimento dell'ospite è rappresentata dalla formazione di appressori, strutture infettive allargate e multinucleate che hanno la funzione di aderire alla superficie radicale per permettere la penetrazione del fungo all'interno delle radici. Gli appressori a loro volta producono ife di penetrazione che crescono nella radice intercellularmente e intracellularmente formando arbuscoli.

Durante lo sviluppo dell'arbuscolo le ife riducono gradualmente il loro diametro e le ife più sottili non sono più visibili al microscopio ottico. Gli arbuscoli si sviluppano a partire da 42 ore dopo che le ife prendono contatto con le radici della pianta ospite (Giovannetti e Citeresi, 1993). Il loro sviluppo è influenzato da diversi fattori, tra cui lo stato nutritivo e fenologico della pianta ospite e la luce.

Dopo aver stabilito la simbiosi il fungo comincia ad assorbire zuccheri semplici dalla pianta ospite e si accresce anche all'esterno della radice formando grandi reti miceliari, la cui funzione principale è l'assorbimento dei nutrienti minerali. Il

micelio esterno aumenta considerevolmente la superficie di contatto fra radici e ambiente. Un apparato radicale micorrizzato in genere è in grado di esplorare un volume di terreno 15 volte superiore a uno non micorrizzato. Il micelio extraradicale è costituito da ife con diametro di 8-20 μm e da ife più sottili adibite all'assorbimento (Bago et al., 1998). Diversi fattori influenzano lo sviluppo delle ife extraradicali, come stato nutrizionale della pianta ospite e condizioni edafiche e ambientali.

Alla fine del ciclo il micelio extraradicale produce nuove spore che possono rimanere dormienti nel terreno o germinare immediatamente e iniziare un nuovo ciclo (Giovanetti, 2000).

Alcune specie fungine producono vescicole, strutture di riserva all'interno delle radici contenenti globuli lipidici.

Scambi metabolici

L'aumento di assorbimento di fosforo dal terreno è il maggior beneficio che apportano le micorrize arbuscolari (Bucher, 2007; Javot et al., 2007), al punto che se nel terreno aumenta la disponibilità di P l'intensità della micorrizzazione diminuisce (Lou e Koide, 1994). Nella rizosfera delle piante non micorrizzate il P è spesso carente poiché, essendo un elemento poco mobile, la velocità di assorbimento risulta più elevata della capacità del terreno di rilasciarlo. Il vantaggio apportato dalla simbiosi micorrizica alla pianta ospite risiede nel fatto che le ife extraradicali si estendono nel terreno più abbondantemente e velocemente delle radici riuscendo ad assorbire il P da zone più ricche. Inoltre i funghi micorrizici influenzano le proprietà fisico-chimiche del terreno contribuendo al rilascio di P da complessi inorganici poco solubili (Finlay, 2008; Parniske, 2008). La micorrizzazione produce incrementi di crescita simili a quelli del P aggiunto (Giovanetti e Avio, 2002; Smith e Read, 1997). L'aumento dell'assorbimento di P varia a seconda della pianta, del fungo e dalla disponibilità di P nel terreno (Sanders e Tinker, 1971; Smith, 1982). Il trasferimento di P dal micelio esterno alla pianta avviene attraverso l'accumulo di granuli di polifosfato entro vacuoli ifali che sono traslocati dalle ife esterne a quelle interne e quindi

rilasciati a livello degli arbuscoli (Harrison e Van Buren, 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001).

I funghi micorrizici arbuscolari possono anche accelerare la decomposizione di materiale organico e assorbire l'azoto che ne deriva (Hodge et al., 2001). Nelle lunghe distanze probabilmente è trasportato sotto forma di arginina ed è ceduto alla pianta probabilmente sotto forma di ammonio (Govindarajulu et al., 2005; Cruz et al., 2007).

I funghi AM sono coinvolti anche nella mobilitazione e nell'assorbimento dal suolo di altri elementi minerali come azoto, zinco, calcio e zolfo (Cooper e Tinker, 1978; Rhodes e Gerdemann, 1978; Mader et al., 2000).

Le piante a loro volta trasferiscono al fungo una quantità di sostanze organiche carboniose che può arrivare al 20% del C fissato con la fotosintesi. La pianta aumenta il flusso di zuccheri verso le radici quando è presente un simbionte fungino, che li assorbe sotto forma di esosi. Il sito di scambio non è stato ancora definitivamente stabilito dato che alcune evidenze suggeriscono che le sostanze carboniose possono essere traslocate al fungo tramite le ife intercellulari anziché attraverso gli arbuscoli (Giovannetti e Avio, 2002). A livello intraradicale il fungo converte gli esosi in glicogeno e lipidi. Sotto questa forma il carbonio viene traslocato dalla parte intraradicale al micelio extraradicale. Chitina e vari tipi di carboidrati sono quindi sintetizzati dal fungo dagli esosi derivanti dal catabolismo del glicogeno e dei lipidi (Fig.2) (Bago et al., 2002; Bago et al., 2003). Il C ceduto dai tessuti della pianta ospite è dunque fondamentale per la produzione di un'abbondante biomassa fungina.

Lavori sperimentali indicano la possibilità che il passaggio di carbonio, azoto e fosforo avvenga anche fra diverse specie di piante interconnesse da un micelio comune. Questo aumenta l'importanza e il potere della rete micorrizica per quanto riguarda l'utilizzo delle risorse del terreno (Francis e Read, 1984; Chiariello et al., 1982; Francis et al., 1986).

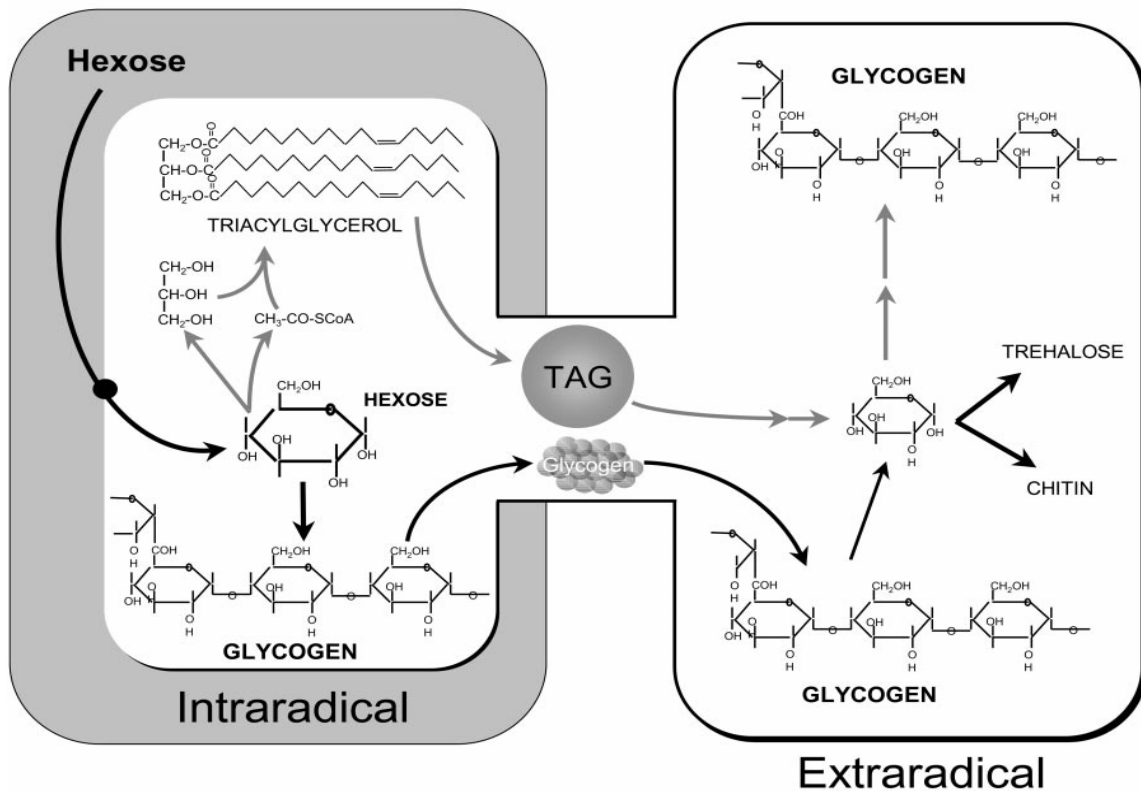


Fig.2. Le due vie attraverso le quali il C viene traslocato dalla parte intraradicale alla parte extraradicale del fungo.

Batteri AM

Nella rizosfera i funghi AM interagiscono anche con diversi tipi di batteri. Queste interazioni si trovano in tutte le fasi del ciclo vitale del fungo, dalla formazione di spore alla colonizzazione delle radici (Bianciotto et al, 1996; 2003; Bianciotto e Bonfante, 2002; Roesti et al, 2005; Toljander et al, 2006). La natura di queste interazioni può essere inibitrice o stimolatrice, competitiva o mutualistica sia fra fungo e batterio sia tra batterio e pianta. L'interazione fra piante, funghi AM e batteri è così forte che Bonfante e Anca (2009) hanno definito la micorrizzazione un'associazione tripartita.

Sono stati trovati diversi gruppi di batteri associati alla rizosfera di piante colonizzate da funghi AM, come batteri azotofissatori (Secilia e Bagyaraj, 1987), rizobatteri promotori della crescita delle piante (von Alten et al, 1993),

solubilizzatori del P (Toro et al, 1996) e antagonisti di patogeni delle piante (Citernes et al, 1996; Budi et al, 1999).

Alcuni batteri vivono associati alle strutture dei funghi AM come le ife esterne (Toljander et al, 2006) e le pareti delle spore (Mayo et al, 1986; Xavier et al, 2003; Roesti et al, 2005). Sono stati trovati anche batteri che vivono all'interno delle spore di alcuni funghi AM (Bianciotto et al, 1996; 2003).

L'importanza ecologica dei batteri associati ai funghi AM e in particolare la loro interazione con i funghi AM e le piante è ancora sconosciuta. Ci sono ricerche che hanno dimostrato che batteri associati alle spore di funghi AM (batteri AM) riescono a indurre la germinazione e la crescita (Mosse, 1962; Walley e Germida, 1996; Xavier e Germida, 2003). I batteri AM possono degradare biopolimeri come proteine, chitina e cellulosa (Filippi et al, 1998; Roesti et al, 2005), inibire la crescita di differenti patogeni delle piante (Budi et al, 1999) e migliorare la struttura del terreno (Andrade et al, 1995). Recentemente Hildebrandt et al. (2002) hanno scoperto che i batteri AM possono stimolare la crescita dei funghi AM fino alla produzione di spore anche in assenza di piante ospite. Queste ricerche dimostrano che i batteri AM possono essere un fattore importante nello sviluppo di funghi AM, nella crescita delle piante e nella protezione delle piante.

Nella rizosfera le specie di piante selezionano i batteri a loro associate (Smith e Goodman, 1999) e determinano la composizione della comunità micotica AM (Sanders e Fitter, 1992; Bever et al, 1996; Eom et al, 2000), mentre le specie di funghi AM influiscono nella selezione di batteri nella micorrizosfera (Roesti et al, 2005).

1.2 Cambiamenti nella pianta indotti dalla micorrizzazione

Negli ultimi vent'anni la ricerca nel campo della simbiosi AM è stata molto intensa e proficua. Questo è potuto succedere soprattutto grazie all'ampliarsi della conoscenza in discipline come la fisiologia delle piante, l'interazione pianta-microrganismi, la biologia molecolare e cellulare, l'ecologia. Le attività di ricerca nel campo delle micorrize arbuscolari sono state condotte attraverso tecniche

che vanno dalla coltura di organi (Declerk et al. 2005), alla prova in serra e in campo (Fitter, 1985; Klironomos et al, 2000; Smith et al. 2003), alle biotecnologie genetiche (Bucher, 2007).

Il principale obiettivo delle ricerche attuali è di capire in modo più approfondito la biologia della simbiosi micorrizica, in particolare a livello delle radici. Per esempio quali sono i segnali scambiati fra i simbionti durante l'instaurarsi della simbiosi (Harrison, 2005) o approfondire i meccanismi di trasporto di P attraverso l'interfaccia fungo AM-radice (Bucher, 2007).

Un aspetto della micorrizzazione abbastanza trascurato dalla ricerca è quello dei cambiamenti fisiologici, e in particolare metabolici, che interessano la parte aerea e i frutti delle piante micorrizzate. Sarebbe interessante capire se la simbiosi AM comporti miglioramenti qualitativi nelle piante coinvolte (Toussaint, 2008). In tal caso l'utilizzo di funghi AM in agricoltura e una gestione agronomica che tenda a favorirne lo sviluppo diventerebbero fattori importanti per il miglioramento dei prodotti agricoli.

Cambiamenti nelle radici

Le piante micorrizzate hanno una concentrazione di saccarosio, glucosio e fruttosio nei tessuti delle radici superiore a quella delle piante non micorrizzate. Una parte di questi zuccheri viene ceduta al fungo simbionte e una parte serve a sostenere la richiesta energetica dei tessuti delle radici coinvolte nella simbiosi. Questo importante trasferimento di zuccheri non è in competizione con altre funzioni della pianta. La simbiosi infatti induce un aumento dell'attività fotosintetica e la quantità di zuccheri sintetizzati è sufficiente per svolgere le normali funzioni e per sostenere la simbiosi (Wright, 1998a).

Un aspetto interessante della micorrizzazione è il suo ruolo nelle relazioni idriche delle piante. Lo scopo di un lavoro di Cui e Nobel (1992) era di verificare il ruolo della simbiosi AM nella conducibilità idrica radicale, la velocità con cui l'acqua riesce ad attraversare le radici per raggiungere il fusto. In questa ricerca la conducibilità idrica aumentava di circa il 20% nelle piante micorrizzate rispetto alle non micorrizzate. Tale aumento sembra che fosse dovuto a una maggior

permeabilità delle membrane cellulari radicali e agli innumerevoli punti di contatto fungo AM-pianta che permettono il passaggio di acqua dal fungo alla pianta. La stessa ricerca ha dimostrato un aumento dell'assorbimento di CO₂ delle piante micorrizate del 19%. L'aumento proporzionalmente simile nell'assorbimento di acqua e CO₂ ci fa pensare che sia dovuto a un bilancio di massa della reazione fotosintetica, che infatti aumenta con la micorrizzazione. Dunque l'aumento della conducibilità idrica radicale sarebbe funzionale all'aumento dell'attività fotosintetica. Questa ricerca ha dimostrato anche che la concentrazione di P è significativamente superiore nei tessuti delle radici delle piante micorrizate.

Per quanto riguarda i cambiamenti morfo-fisiologici e biochimici delle radici indotti dalla colonizzazione intraradicale da parte dei funghi sono molti, regolati dall'interazione dei genomi della pianta e del fungo e da fattori ambientali. I meccanismi molecolari che controllano il processo di colonizzazione e lo sviluppo della micorrizzazione sono ancora per lo più sconosciuti.

Ci sono prove che la pianta controlla la crescita intraradicale del fungo, almeno in parte, attraverso una regolazione differenziale del proprio sistema di difesa (Lambais e Mehdy, 1995). Una delle prime risposte della pianta a un'infezione patogena è l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno come O₂⁻ e H₂O₂ nel sito dell'infezione (Lamb e Dixon, 1997). Anche durante la micorrizzazione arbuscolare è stata osservata la produzione di una notevole quantità di specie radicaliche localizzate nella zona di contatto col fungo, ma sembra che questo fenomeno sia strettamente controllato dall'attività di enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi e la catalasi (Lambais et al, 2003). Inoltre sin dai primi momenti della colonizzazione da parte dei funghi AM viene stimolata la produzione di composti secondari nelle radici delle piante ospite legati alla patogenesi. Queste molecole sono flavonoidi, antimicrobici a basso peso molecolare come le fitoalessine (VanEtten et al, 1994; Scharff et al, 1997) e proteine come le beta-1,3-glucanasi (Bonfante e Perotto, 1995; Benhamou, 1996). Ma la produzione di questi composti è più lenta e la concentrazione si mantiene a livelli più modesti rispetto a quanto avvenga durante l'interazione con microrganismi patogeni. Alcuni esperimenti hanno dimostrato che flavonoidi e

isoflavonoidi stimolano la germinazione dei funghi AM e l'instaurarsi del legame fungo-radice. Ma i meccanismi con cui i simbionti si scambino segnali è ancora oscuro (Morandi, 1996) . Si sa che i funghi ectomicorrizici producono loro stessi metaboliti secondari che proteggono le radici da patogeni (Jones e Last, 1991).

Alcune ricerche indicano che la micorrizzazione stimola anche la sintesi di carotenoidi nelle radici (Fester et al, 2002). Una successiva ricerca ha confermato l'aumento del contenuto di questa classe di molecole nelle radici di carota (Regvar et al, 2003). Uno studio condotto su piante di cocomero ha scoperto che tre composti dell'estratto lipofilo delle radici micorrizzate hanno una concentrazione molto superiore che nell'estratto di radici non micorrizzate. Queste molecole sono state identificate come triterpeni. Due di questi non erano ancora stati isolati (acido 2 β -idrossibrionolico e acido 3 β -brioferulico) mentre uno era già conosciuto (acido brionolico) (Akiyama e Hayashi, 2002).

Una ricerca condotta da Schützendübel e Polle (2002) dimostra che le piante micorrizzate sono spesso meno sensibili a intossicazione da cadmio. Fra gli effetti sui tessuti vegetali di un inquinamento da cadmio, come da molti altri metalli, vi è induzione di stress ossidativo, una forte perdita di glutathione e l'inibizione di enzimi antiossidanti. Sembra che la mancanza di glutathione abbia un ruolo basilare nel deperimento della pianta. E' possibile che i funghi AM aiutino la pianta a tollerare questa intossicazione attraverso una notevole produzione di glutathione. Sembra infatti che colture pure di funghi AM producano una quantità di questo antiossidante molto superiore rispetto alle colture di radici senza micorrizzazione. Un altro meccanismo di protezione da inquinamento da cadmio a opera dei funghi AM potrebbe essere il rilascio nella rizosfera di molecole chelanti che ne limiterebbero l'ingresso nella pianta.

Cambiamenti nella parte aerea della pianta

Per quanto riguarda il metabolismo primario, la presenza di simbiosi AM può aumentare nelle piante l'assorbimento di CO₂ del 20% (Cui e Nobel, 1992; Wright et al, 1998b). La colonizzazione di funghi AM aumenta inoltre il numero di foglie, le loro dimensioni e l'area fogliare specifica (Lu e Koide, 1994; Regvar et

al, 2003). Tale accorgimento permetterebbe alle piante micorrizzate di aumentare a parità di massa fogliare la quantità di CO₂ assorbita (Wright et al, 1998b). Una recente ricerca dimostra inoltre che i tessuti di prezzemolo micorrizzato contengono una quantità di clorofilla maggiore (Regvar et al, 2003). Siccome i tessuti della parte aerea delle piante micorrizzate hanno una concentrazione di N e P maggiore rispetto alle piante non micorrizzate, nella ricerca di Wright et al (1998b) N e P sono stati somministrati alle piante non micorrizzate a livello fogliare. In questo modo la concentrazione dei due elementi nei due tipi di pianta poteva essere considerata la stessa. In questo caso l'aumento dell'attività fotosintetica non è accompagnato da un rilevante aumento della biomassa delle piante micorrizzate. Molte ricerche in cui la concentrazione di nutrienti nei tessuti delle piante non erano stati influenzati dall'esterno dimostrano che le piante coinvolte da simbiosi AM hanno un apparato aereo significativamente maggiore (Lu e Koide, 1994; Regvar et al, 2003). Questo ci suggerisce che l'aumento dell'attività fotosintetica indotta dalla micorrizzazione è causata direttamente dal fungo AM per sostenere i propri bisogni alimentari e indirettamente dal migliore stato nutrizionale della pianta che può così aumentare le sue dimensioni.

La simbiosi AM influenza anche gli scambi idrici della pianta con l'esterno. Alcune ricerche hanno dimostrato che le piante micorrizzate assorbono una quantità maggiore di acqua dal terreno. Questo sembra sia dovuto all'aumento del fabbisogno idrico della piante micorrizzate che, dovendo soddisfare anche il fabbisogno alimentare del micelio fungino, devono aumentare l'attività fotosintetica (Cui e Nobel, 1992). A differenza di quanto succede nelle piante non micorrizzate, a basse concentrazioni idriche del terreno le piante micorrizzate mantengono alta la traspirazione della parte aerea e quindi la perdita d'acqua (Ruiz-Lozano e Azcón, 1995; Duan et al, 1996). Questo comportamento sembra che dipenda da un diverso stato ormonale delle due piante. Durante uno stress idrico infatti, l'acido abscissico nello xilema e nelle foglie nelle piante micorrizzate è presente in concentrazioni più basse. Fra i molteplici effetti l'acido abscissico agisce da regolatore negativo dell'apertura stomatica in condizioni di stress in modo da limitare la traspirazione. La conclusione è che probabilmente i funghi

micorrizici aumentano la capacità del sistema radicale di assorbire acqua in condizioni di stress idrici. Dunque le piante micorrizzate hanno una resistenza alle carenze idriche maggiore delle piante non micorrizzate (Duan et al, 1996). Una precedente ricerca sempre condotta in vaso (Levy et al, 1982) arriva a conclusioni opposte. Levy et al. (1982) hanno constatato che la conducibilità idrica radicale delle piante micorrizzate era stata compromessa maggiormente dallo stress idrico rispetto a quella delle piante non micorrizzate. La loro conclusione è che la maggior densità dell'apparato assorbente e la maggior traspirazione delle piante micorrizzate consumino le risorse idriche del terreno più velocemente. Raggiungendo più velocemente la condizione di stress idrico le piante micorrizzate subirebbero danni maggiori di quelle non micorrizzate. Ma le dinamiche in campo sono state dimostrate essere diverse. Subramanian et al (2005) hanno rilevato che sia in condizione di irrigazione ottimale che di stress idrico, le piante di pomodoro colonizzate da funghi AM si trovano in uno stato nutrizionale migliore rispetto alle piante non micorrizzate. In particolare le piante micorrizzate hanno una maggior quantità di N e P, un maggior peso secco, producono più fiori e frutti. All'aumentare della carenza idrica cresce anche il divario dello stato nutrizionale e di idratazione dei tessuti dei due tipi di pianta. Per quanto riguarda l'influenza della micorrizzazione sugli elementi minerali la ricerca si è concentrata molto sul loro assorbimento dal suolo (Marschner e Dell, 1994; Smith e Read, 1997) e sulla traslocazione nei tessuti delle piante (Johansen et al, 1994; Zhu et al, 2001; Smith et al, 2003; Toussaint et al, 2004). In una ricerca recente sono stati coltivati biologicamente in pieno campo mutanti di pomodori difettivi nella capacità di stabilire simbiosi micorriziche e il loro progenitore non mutato (Cavagnaro et al, 2006). Entrambi i genotipi hanno crescita simile in condizione di non micorrizzazione. Il terreno adiacente le radici, le radici, la parte aerea e i frutti sono stati analizzati e i risultati confrontati. La parte aerea delle piante micorrizzate hanno un peso secco leggermente superiore. La concentrazione di N è superiore nei tessuti delle piante micorrizzate mentre la concentrazione nel terreno adiacente alle loro radici di NO_3^- è significativamente inferiore rispetto a quella nel terreno delle piante non

micorrizzate. Questi dati suggeriscono che non solo le micorrize arbuscolari svolgono un importante ruolo nella nutrizione azotata delle piante ma contribuiscono nell'ecosistema a limitare l'accumulo di nitrati. Questo è particolarmente importante negli agroecosistemi in cui l'accumulo di N inorganico e il suo assorbimento nelle colture spesso non è sincronizzato (Robertson et al, 1997). La concentrazione di P nella parte aerea delle piante micorrizzate è molto più alta che in quelle non micorrizzate. Questo dato è in accordo con molte ricerche precedenti (Cui e Nobel, 1992; Elke e Eckhard, 2005) ma contrasta con un'altra in cui la micorrizzazione non aveva dato significative differenze nella concentrazione di P (Burleigh et al, 2002). Come nel caso dell'N a una più alta concentrazione nei tessuti delle piante micorrizzate corrisponde una più bassa concentrazione nel terreno. Queste differenze dovrebbero essere dovute alla più elevata capacità del sistema radicale micorrizzato di assorbire i nutrienti (Olsson et al, 2002; StJohn et al, 1983; Tibbet, 2000). La micorrizzazione induce nei tessuti delle piante anche un significativo incremento della concentrazione di Zn. Un discreto aumento di Zn nella parte aerea delle piante micorrizzate è stato rilevato anche dalle ricerche di Cui ed Elke (Cui e Nobel, 1992; Elke e Eckhard, 2005). Uno studio di Marschner e Dell (1994) ha calcolato che il 25% dell'assorbimento di Zn da parte delle piante può essere fornito dalle micorrize. La concentrazione di Mn, Fe e Mg nelle piante micorrizzate è invece più bassa. La diminuzione nella concentrazione di Mn nella parte aerea e radici delle piante micorrizzate era già stata dimostrata precedentemente. La micorrizzazione proteggerebbe inoltre le piante da un'intossicazione dovuta a un eccesso di Mn nel terreno. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto a una selezione dei microrganismi della rizosfera operata dai funghi AM. La micorrizzazione potrebbe favorire il proliferare dei batteri ossidatori del manganese aumentando la percentuale ossidata di questo elemento nel terreno, meno solubile del Mn ridotto (Arines et al, 1989; Kothari et al, 1991; Marschner, 1995). Una recente ricerca di Nogueira et al (2007) conferma una diminuzione del Mn nella parte aerea delle piante micorrizzate. Tuttavia la selezione operata dai funghi AM sulla rizosfera è stata provata determinare un aumento dei batteri riduttori del Mn,

aumentando di fatto la solubilità di questo elemento. Dunque la micorrizzazione proteggerebbe la pianta ospite da un eccesso di Mn con altri sistemi ancora da investigare. Nogueira et al (2007) avanzano l'ipotesi che le piante micorrizzate risentano meno di un inquinamento da Mn perché la più alta concentrazione di P nei tessuti ne faciliterebbe la detossificazione. I meccanismi con cui i funghi AM condizionano i microrganismi del terreno sono comunque molto complessi. Dipendono dalle specie dei funghi stessi, dal pH e dalla composizione chimica del terreno. L'influenza dei microrganismi selezionati nella rizosfera risulta dunque imprevedibile nei casi specifici, se non addirittura opposta. Il lavoro di Nogueira et al (2007) rileva una diminuzione anche del Fe nei tessuti delle piante micorrizzate. Come nel caso del Mn, la solubilità di questo metallo sembra aumentare sotto l'influenza dei batteri selezionati dai funghi AM. Anche per il Fe dunque, la micorrizzazione opererebbe una limitazione nell'assorbimento attraverso meccanismi ancora da chiarire. La pianta micorrizzata potrebbe essere protetta da un eccessivo assorbimento di metalli anche dalla glomalina, una particolare proteina secreta in abbondanza nella rizosfera dai funghi AM. Sembra infatti che questa crei dei legami molto stabili con i metalli e, grazie alla sua lipofilia, il costrutto glomalina-metallo rimarrebbe edeso alle parti solide del terreno rendendo la soluzione circolante povera di metalli (Gonzales-Chevez et al, 2004). Questo meccanismo di difesa delle micorrize spiegherebbe una precedente ricerca di Kothari et al (1991). Delle piante di mais sono state cresciute su un terreno sterile, su un terreno inoculato con microrganismi della micorrizosfera escludendo i funghi AM e su un terreno inoculato con gli stessi microrganismi compresi i funghi AM. Dal confronto delle analisi della concentrazione di Mn nei tessuti dei tre tipi di pianta si è osservato che quelle che ne contenevano più di tutte erano le piante cresciute su terreno inoculato con i microrganismi della micorrizosfera senza funghi AM mentre quelle che ne contenevano di meno erano le piante cresciute su terreno inoculato con microrganismi comprensivi di funghi AM. Le piante cresciute su terreno sterile avevano una concentrazione di Mn intermedia.

L'assorbimento di Mg invece può essere inibito competitivamente da altri cationi del suolo, fra cui K, Ca e soprattutto Mn. E' importante segnalare un aumento della concentrazione di Na nelle piante micorrizate, fatto che non ha ancora trovato spiegazione (Cavagnaro et al, 2006).

Fino a poco tempo fa la ricerca si e' occupata poco dell'accumulo di composti secondari nelle parti aeree delle piante micorrizate. Ci sono state ricerche sull'attività degli antiossidanti nelle piante micorrizate, ma soprattutto in risposta a stress abiotici (Schutzendubel e Polle, 2002; Porcel e Ruiz-Lozano, 2004). Una ricerca volta a studiare l'influenza delle micorrize sulle piante orticole ha rilevato che le piante di prezzemolo micorrizate hanno un contenuto di carotenoidi superiore alle stesse piante non micorrizate (Regvar et al, 2003). Si sa inoltre da molti anni che differenti specie di funghi micorrizici possono contribuire ad aumentare la produzione e resa di oli essenziali in piante medicinali come la menta (Sirohi e Singh, 1983). Ma nessun meccanismo, a parte l'aumento dello stato nutrizionale, e' stato proposto per spiegare queste osservazioni. Un recente studio condotto sul basilico ha confermato l'influenza positiva della micorrizzazione sulla quantità di oli essenziali prodotti. L'aumento della produzione di oli essenziali sarebbe correlato a un aumento del numero di tricomi ghiandolari prodotti dalle piante micorrizate (Copetta et al, 2006). Un altro studio ha riportato aumenti nella concentrazione degli oli essenziali in piante di origano colonizzate da funghi AM che non sono in relazione a un aumento nella nutrizione in P (Khaosaad et al, 2006). E' stato inoltre dimostrato che la simbiosi AM induce la produzione di antiossidanti nella parte aerea in piante di basilico (Toussaint, 2007). La micorrizzazione conferisce inoltre un effetto bioprotettivo in piante di basilico (*Ocimum basilicum*) contro *Fusarium oxysporum f.sp. basilici* riducendo la mortalità delle piante micorrizate. E' stato ipotizzato che questo effetto bioprotettivo sia il risultato di un aumento nelle foglie di acido rosmarinico e caffeico negli oli essenziali. Neanche questo effetto protettivo e' legato all'aumento di nutrizione fosforica (Toussaint et al, 2008). Questi risultati infatti sono stati ottenuti mantenendo la stessa concentrazione di P nei tessuti delle piante micorrizate e non. Finora è stato dunque dimostrato che l'accumulo di

composti secondari nella parte aerea di piante micorrizzate non dipende da miglioramenti nutrizionali, e che sono necessarie ancora ricerche per capire i meccanismi con cui i funghi micorrizici influiscono sul metabolismo della parte aerea. Si sa inoltre che i funghi ectomicorrizici producono loro stessi metaboliti secondari che proteggono le radici da patogeni (Jones e Last, 1991). Se questi composti venissero traslocati nella parte aerea della pianta questo potrebbe aumentare le difese della pianta contro gli erbivori. Così i funghi micorrizici arbuscolari potrebbero conferire una sorta di protezione alle piante ospite che le renderebbe meno appetibili ai fitofagi. Questa è solo un'ipotesi, ma spiegherebbe la riduzione della sopravvivenza delle larve di un lepidottero (Noctuidea) quando nutrite con foglie di piante micorrizzate rispetto a quelle nutrite con foglie di piante non micorrizzate (Rabin e Pacovsky, 1985). L'effetto non è correlato ad alcun aumento del contenuto fenolico totale e non sono stati proposti altri meccanismi che possano spiegare come i funghi AM renderebbero le foglie meno appetibili.

Le nuove tecniche e approcci oggi a disposizione, tecniche molecolari, metabolomica, studi dell'espressione dei geni e proteomica, potrebbero aiutare molto a chiarire le interazioni micorriziche (Cànovas et al, 2004; Bezemer e Van Dam, 2005).

Cambiamenti nel frutto

Gli effetti della micorrizzazione sui frutti sono ancora poco studiati.

Ricerche condotte su specie orticole hanno dimostrato che il numero di fiori prodotti per pianta è direttamente proporzionale alla biomassa di micelio che si sviluppa durante la micorrizzazione. Ma questo aumento non sembra tradursi in un maggior numero di frutti (Regvar et al, 2003). Anche un precedente studio sugli effetti della micorrizzazione sui fiori e semi di malva aveva riscontrato un aumento nel numero di fiori delle piante micorrizzate (Lu e Koide, 1994). Ma al contrario di quanto sostenuto da Regvar et al (2003) questo si tradurrebbe in un aumento anche nel numero di frutti. La simbiosi secondo questa ricerca aumenterebbe anche il numero di semi per frutto. Il motivo del miglioramento

della fertilità potrebbe essere il fatto che le piante micorrizate anticipano il periodo della fioritura aumentando la durata di questa fase. Dunque la pianta riesce a produrre un numero maggiore di fiori e aumenta la probabilità che questi vengano fecondati. L'aumento della fertilità delle piante dovuto alla micorrizzazione è simile a quello correlato al miglioramento dello stato nutrizionale. La micorrizzazione influisce positivamente anche sul peso e sul contenuto di P dei semi. Entrambi questi parametri influenzano il vigore della progenie. Un maggior contenuto di P nei semi può essere un vantaggio soprattutto quando il terreno di semina ne è scarso (Lu e Koide, 1994).

Per indagare l'influenza della micorrizzazione sugli elementi nutritivi dei frutti sono state coltivate in campo piante di pomodoro mutanti deficienti nella capacità instaurare simbiosi micorrizica e piante non mutanti. La differenza nella concentrazione degli elementi dei frutti segue una tendenza simile a quella delle parti aeree. La concentrazione di P nei frutti delle piante coinvolte in una simbiosi AM è notevolmente più alta di quella nei frutti che non lo sono. Di particolare interesse è l'incremento nei frutti di piante micorrizate della concentrazione di Zn. Questo dato è abbastanza importante dal punto di vista alimentare. Sembra infatti che lo Zn sia spesso coinvolto nelle deficienze nutrizionali minerali (Welch e Graham, 2004). La concentrazione di Mn è invece superiore nei frutti delle piante non micorrizate. Anche la concentrazione di Na è superiore nelle piante non micorrizate, contrariamente a quanto avviene per la parte aerea (Cavagnaro et al, 2006).

Sembra che i pomodori di piante coinvolte in simbiosi AM abbiano un'acidità titolabile più alta e che nel periodo della raccolta le stesse piante abbiano una maggior quantità di frutti ancora acerbi. Questo dimostrerebbe che i frutti di piante micorrizate hanno la tendenza a maturare più lentamente e in generale che le piante micorrizate hanno un periodo di fruttificazione più lungo rispetto alle piante non micorrizate (Regvar et al, 2003).

Per quanto riguarda i composti secondari, i pomodori di piante micorrizate hanno un contenuto di carotenoidi superiore a quelli di piante non micorrizate (Regvar et al, 2003).

1.3 Qualità dei frutti

Il tentativo meglio riuscito di definire il concetto di qualità è contenuto nella specifica norma UNI-ISO (International Organization of Standardization, fondata a Londra nel 1947, alla quale aderiscono gli enti normatori di circa 90 Paesi, fra i quali quelli membri della Comunità, e in particolare l'Ente Italiano di Unificazione (UNI) e da poco la stessa C.E.). Si tratta della norma UNI-ISO 8402, del 1995, secondo la quale la qualità è "l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto o servizio che conferiscono a esso la capacità di soddisfare le esigenze, espresse o implicite, di una potenziale utenza". La vastità dei gusti e delle preferenze fa sì che non si possa individuare una definizione migliore. Il giudizio sulla qualità di un bene è fortemente soggettivo quando si superi il più oggettivo aspetto igienico-sanitario (Costato, 2007). La qualità di un alimento comprende infatti una parte costituita dalla sicurezza e dal contenuto nutrizionale, che può essere misurata strumentalmente, e da una parte sensoriale soggettivamente percepita dal consumatore (Shewfelt, 1999).

Sicurezza

Per poter essere definito sicuro un alimento non deve essere dannoso per la salute umana. L'art. 14 del reg. 178/2002, regolamento CE relativo ai principi e requisiti generali della legislazione alimentare, stabilisce che per determinare se sia dannoso per la salute occorre prendere in considerazione "non soltanto i probabili effetti immediati e/o a breve termine e/o a lungo termine dell'alimento sulla salute di una persona che lo consuma, ma anche su quella dei discendenti". Occorre inoltre prendere in considerazione "i probabili effetti tossici cumulativi di un alimento". L'articolo specifica inoltre che "gli alimenti a rischio non possono essere immessi sul mercato". L'ingestione di un alimento dannoso può provocare un'infezione o un'intossicazione (Galli Volonterio, 2005).

Col termine infezione si intende la penetrazione e la moltiplicazione di microrganismi patogeni (virus, batteri, miceti, protozoi, metazoi) in un macrorganismo (pianta, animale, uomo). I microrganismi presenti su frutta e verdura freschi sono soprattutto lieviti, spore di muffe e batteri lattici e acetici.

Realizzata dal vento e dagli insetti, la loro disseminazione è ripartita irregolarmente su tutta la pianta. Mentre però il loro numero si mantiene basso su foglie, rami e frutti acerbi, la buccia dei frutti in maturazione viene colonizzata. Si moltiplicano preferenzialmente sugli essudati liberati da microlesioni e nelle zone situate attorno agli stomi (Ribèreau-Gayon, 1998). Questi microrganismi non sono patogeni e il loro numero è basso su frutti integri. Dunque il consumo di frutta e verdura freschi non implica il rischio di infezione. Fanno eccezione i casi in cui la superficie dei frutti e delle verdure venga in contatto con microrganismi patogeni. Questo può avvenire durante la fertilizzazione con letame o per l'utilizzo di acque di irrigazione contaminate da acque reflue o liquami. È stato stimato che utilizzando un tipo di irrigazione con getto a spruzzo rispetto a un'irrigazione di tipo superficiale il tasso di contaminazione da microrganismi patogeni può aumentare dal 19% al 90% (Food and Drug Administration, 2005). I casi di tossinfezione contratta attraverso l'assunzione di vegetali sono dovuti principalmente a batteri appartenenti alle *Enterobacteriaceae*, soprattutto i generi *Escherichia* e *Salmonella*. I batteri di questa famiglia sono bacilli ubiquitari che spesso proliferano nell'intestino.

Per intossicazione si intende uno stato patologico dell'organismo causato dall'azione di una sostanza tossica per natura e dosaggio. Una sostanza tossica è quella che assunta da un organismo vivente ha effetti dannosi temporanei o permanenti fino a letali, attraverso un meccanismo chimico. Il concetto di veleno non può essere separato dal concetto di dose. Tutte le sostanze infatti possono provocare danni su un organismo vivente, quello che permette di identificare una sostanza come tossica è la dose a cui provoca effetti dannosi. Per esprimere la concentrazione di una sostanza in funzione della tossicità si utilizza il termine DL50. Si riferisce alla dose di una sostanza in grado di uccidere il 50% di una popolazione campione di cavie. La dose è espressa generalmente in mg di sostanza saggiata per kg di peso vivo. La mutagenicità o genotossicità è un particolare tipo di tossicità che consiste nell'indurre modificazioni all'interno della sequenza nucleotidica o della struttura a doppia elica del DNA di un organismo vivente. Le mutazioni possono avvenire a livello della linea germinale o somatica.

Nel primo caso queste possono essere trasmesse alla prole, mentre nel secondo interessano solo la linea cellulare mutata e possono portare a formazioni neoplastiche e quindi cancro. I test di mutagenesi sono analisi genetiche utilizzate per verificare la capacità di indurre mutazioni genetiche da parte di agenti fisici o chimici. I test possono essere compiuti su cellule, tessuti o interi organismi. Nei primi due casi si parla di test di mutagenesi in vitro, nel terzo di test in vivo. La capacità di provocare mutazioni è spesso associata alla capacità di provocare il cancro. Per questo motivo molti test hanno lo scopo di valutare la cancerogenicità di un agente valutandone la mutagenicità. Non tutte le sostanze mutageniche sono cancerogene e vice versa (Mortelmans e Geiger, 2000; Mateuca et al, 2006). Le sostanze tossiche e/o mutagene possono avere un'origine biotica o abiotica.

Al primo tipo appartengono le tossine prodotte da alcuni funghi e batteri. I frutti integri e ben conservati non presentano cariche microbiche tali da indurre intossicazioni o mutazioni. Eventuali attacchi microbici sarebbero comunque evidenti e renderebbero il prodotto immangiabile. Al contrario frutti essiccati, semi oleosi e granaglie sono suscettibili di attacchi fungini poco evidenti che lasciano l'alimento pressoché intatto. Tali funghi spesso sono produttori di micotossine. Questi metaboliti secondari sono prodotte da oltre 200 specie di funghi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Tricotecium*. Possono causare effetti tossici di tipo acuto, subacuto, mutageno e cancerogeno (Galli Volonterio, 2005). Sostanze tossiche sono prodotte dalle piante stesse. Le bacche di *Atropa belladonna* per esempio contengono una miscela di alcaloidi tossici in grado di provocare anche la morte. Le bacche di *Solanum dulcamara* e le patate germogliate contengono alte concentrazioni di solanina, capace di provocare vomito e convulsioni. *Bryonia dioica*, *Solanum nigrum*, i semi di *Laburnum anagyodes* possono provocare intossicazioni anche mortali. Anche molti frutti e vegetali utilizzati nell'alimentazione contengono sostanze tossiche, che sono presenti in dosi innocue per l'uomo o sono termolabili e vengono denaturate con la cottura. La solanina è un alcaloide glicosidico tossico prodotto da alcune *solanacee*. E' presente in ogni parte della

pianta comprese foglie, frutti e radici, come difesa contro funghi e insetti. L'ingestione di elevate quantità di solanina provoca alterazioni nervose, emolisi e irritazione della mucosa gastrica. Se assunta in dosi particolarmente elevate può risultare mortale. Nelle patate la solanina si concentra soprattutto nelle foglie e nei fusti. Normalmente assente nei tuberi, inizia a formarsi non appena vengono esposti alla luce solare. Nei pomodori e nelle melanzane il contenuto in solanina è inversamente proporzionale al grado di maturazione. Mano a mano che il pomodoro acquista colore e la melanzana raggiunge le giuste dimensioni la concentrazione di solanina diminuisce. Essendo termolabile, la cottura dell'alimento riduce sensibilmente la concentrazione di questo alcaloide. Altri alcaloidi tossici presenti nelle solanacee sono l'atropina e la solanocapsina. L'amigdalina è un'altra molecola tossica contenuta, anche se in dosi piuttosto basse, nei semi di diverse rosacee, nelle mandorle, nei fagioli, nelle patate dolci e nel mais. E' un glucoside cianogenico, ovvero capace di liberare acido cianidrico per azione enzimatica. I nitrati (NO_3^-) sono composti cancerogeni contenuti negli ortaggi in quantità dipendente dalle caratteristiche del terreno e dall'uso di fertilizzanti azotati. Le verdure che ne contengono di più sono gli spinaci, la bietola, i cavoli, i broccoli, la lattuga. I nitrati contenuti negli ortaggi non dovrebbero dare preoccupazioni per la salute se si eliminano dalla propria alimentazione i cibi che contengono nitrati come additivo (carni conservate e salumi). L'acido ossalico è un fattore antinutrizionale presente in numerosi prodotti vegetali fra cui spinaci, rabarbaro, cereali integrali e cavoli. Una volta ingerito si combina con diversi minerali, soprattutto Ca, formando dei sali detti ossalati che ne impediscono l'assorbimento. Ad alte concentrazioni l'acido ossalico è tossico, ma essendo poco assimilabile i casi di avvelenamento sono molto rari. Nonostante la tossicità di alcune componenti tuttavia, il consumo quotidiano di frutta, noci e vegetali è associato a una riduzione del rischio di cancro, malattie del sistema circolatorio e infarti (Tomas-Barberan e Robins, 1997; Prior e Cao, 2000; Southon, 2000; Wargovich, 2000). Studi tossicologici sono stati condotti anche sui più diffusi composti secondari delle piante. I polifenoli sono molecole largamente presenti nel regno vegetale. La loro

assunzione con l'alimentazione ha molteplici effetti biomedici positivi. Tuttavia diverse ricerche hanno dimostrato che *in vitro* alte concentrazioni inducono mutazioni puntiformi e aberrazioni cromosomiche. Ma la mutagenicità osservata *in vitro* non è stata confermata negli esperimenti *in vivo*. Somministrazioni orali di alte quantità di polifenoli infatti non provocano mutazioni nelle cellule somatiche degli animali (Delaney et al, 2002; Harwood et al, 2007; Takumi-Kobayashi et al, 2008). La spiegazione a questa discrepanza non è ancora definitiva. E' probabile che l'attitudine ad autossidarsi tipica dei polifenoli produca *in vitro* un ambiente ossidante che favorirebbe la formazione di specie reattive dell'ossigeno. Queste a loro volta danneggerebbero la sequenza nucleotidica o la struttura a doppia elica del DNA delle cellule ivi coltivate. In una matrice vivente invece i polifenoli ossidati sono rigenerati da altri antiossidanti ed enzimi. In questo modo la quantità di specie reattive dell'ossigeno si manterrebbe a livelli normali anche con un'alta concentrazione di polifenoli (Harwood et al, 2007). Il licopene appartiene al gruppo dei carotenoidi, molecole presenti in tutti i frutti e vegetali. Uno studio tossicologico (McClain e Bausch, 2003) ha dimostrato che questa molecola ha una DL50 molto alta, dunque non può essere considerata tossica. I test di mutagenesi *in vitro* non hanno dato risposte positive e non sono stati notati effetti teratogeni, sviluppo anormale di alcune regioni del feto. Sembra che il licopene in eccesso sia accumulato, anche in notevole quantità, nelle cellule epatiche senza causare cambiamenti istopatologici. Questo effetto è reversibile perché quando la somministrazione del pigmento cessa, le cellule epatiche lo cedono al sangue. Negli esseri umani ci sono stati casi di intense esposizioni al licopene senza significativi effetti nocivi.

I contaminanti alimentari di origine abiotica possono essere molecole provenienti da processi industriali (come i policlorobifenili), prodotti della combustione (diossine e idrocarburi policiclici aromatici), elementi tossici (come piombo, mercurio, cadmio e arsenico), contaminanti radioattivi, additivi chimici e sostanze utilizzate in agricoltura (pesticidi), zootecnia (antibiotici e anabolizzanti) o nelle lavorazioni industriali. Queste molecole hanno una notevole tossicità patologica e spesso importanti effetti mutageni e/o cancerogeni e/o teratogeni.

Contenuto nutrizionale

I frutti e i vegetali assunti con l'alimentazione contribuiscono al 91% del fabbisogno umano di vitamina C, al 48% di vitamina A, al 27% di vitamina B₆, 17% di tiamina, 16% di niacina, 16% di Mg, 19% di Fe e al 9% di calorie. I vegetali sono anche importanti fonti di fibre, acido folico, riboflavina, Zn, Ca, K e P. Le noci sono un'ottima fonte di acidi grassi essenziali, di proteine nobili, vitamina E e minerali (Kader, 2002).

La quantità di acqua nei frutti varia tra il 60% dell'avocado fino a valori molto alti, oltre il 95% per il cocomero. La maggior parte della frutta ha valori di umidità vicino al 90%.

Quella dei glucidi è sicuramente la componente maggioritaria nella composizione dei frutti, con valori che variano dal 20% sul totale di sostanza secca del limone, al 50% delle albicocche e dei pomodori, al 70% del pompelmo, al 90% del babaco. In termini assoluti, comunque, data la elevata quantità d'acqua della frutta fresca, la quantità di glucidi, principalmente zuccheri semplici, variano da 1,4 nel limone a 17 g/100g di prodotto (Cabras e Martelli, 2004). L'amido è presente soprattutto nei frutti immaturi, sotto forma di piccoli granuli all'interno delle cellule del mesocarpo. Durante la maturazione l'amido viene metabolizzato in zuccheri semplici. Altri polisaccaridi presenti nei frutti sono cellulosa, emicellulosa e pectina. Questi si trovano nella parete cellulare e la loro quantità varia molto a seconda delle specie (Kader, 2002).

Il contenuto proteico dei frutti è piuttosto limitato ed è costituito soprattutto da enzimi. I valori variando dallo 0,2% per la mela a valori poco superiori all'1% per pomodoro, banana, kiwi e more, con gran parte dei frutti tra lo 0,5% e l'1%. Per alcuni tipi di prodotto a basso contenuto in acqua (cocco e avocado) i valori di contenuto proteico si elevano raggiungendo il 3-4% su 100g di prodotto fresco.

Relativamente al contenuto in lipidi, la quantità contenuta nei frutti è generalmente molto bassa, con valori sempre inferiori o vicini allo 0,5%, fino all'1% per la mela cotogna, al 23% per l'avocado e 36% per il cocco. Sotto l'aspetto qualitativo, i lipidi presenti nei frutti sono, generalmente, rappresentati

principalmente da triacilgliceroli esterificati con acidi grassi monoinsaturi, principalmente acido oleico, acido linoleico e una piccola quantità di polinsaturi. La presenza di acidi grassi saturi nei frutti è normalmente ridotta (tra il 5% dei lipidi totali della pera e il 30% nell'uva) ma può risultare più importante in alcuni casi (ad esempio il cocco, con oltre l'85% dei grassi totali).

I composti bioattivi nelle piante sono composti nutritivi e non nutritivi la cui assunzione è associata a una riduzione del rischio di alcune malattie. I composti bioattivi presenti nella frutta si possono dividere in cinque categorie: vitamine e minerali fra i composti nutritivi, e antiossidanti, fitoestrogeni e fibra dietetica fra i composti non nutritivi (Sacchetti, 2003).

Evidenze significative sono state rilevate nel contenuto vitaminico dei prodotti frutticoli. La frutta è essenzialmente conosciuta per essere un'importante fonte di acido ascorbico (vitamina C). La vitamina D, che è liposolubile, è assente nella frutta, mentre la vitamina E, anch'essa liposolubile, è presente in piccole quantità in alcuni frutti. La frutta è una fonte da scarsa a moderata delle vitamine del gruppo B anche se alcuni (prugne e pomodori) sono una buona fonte di niacina (vitamina B3 o pp) e altri (fragole, uva e agrumi) presentano significative quantità di folati (vitamina Bc o M). La vitamina A è liposolubile e non è presente come tale nei frutti, che possono invece contenere carotenoidi, composti convertibili in vitamina A. Molta della provitamina A nei frutti è rappresentata dal β -carotene e da minori quantità di α -carotene, γ -carotene e altri pigmenti carotenoidi. La frutta non è una fonte primaria di carotenoidi, ma prugne e albicocche ne contengono una quantità moderata, mentre pesche, nettarine e mandarini ne contengono una piccola ma significativa quantità. Alcune tra le vitamine elencate (vitamina C, E e caroteni) presentano oltre all'attività nutritiva, anche una buona attività antiossidante.

I minerali sono per lo più ioni di metalli che vengono assorbiti dalla pianta e traslocati nel frutto. I frutti contengono una grande varietà di elementi minerali e circa 14 di essi sono considerati costituenti nutrizionali essenziali. Sebbene i prodotti frutticoli non siano particolarmente ricchi di minerali il K è l'elemento più abbondante e occorre in combinazione con diversi acidi organici. Il suo

contenuto varia da circa 200 mg per 100g di prodotto negli agrumi fino a 400 mg in ribes e kiwi (Cabras e Martelli, 2004). Nell'organismo umano il K e' necessario per il mantenimento dell'equilibrio acido-basico e osmotico e dell'attivita' neuromuscolare. Un'adeguata assunzione di K puo' diminuire la pressione sanguigna, ridurre il rischio di infarto e prevenire la calcolosi (Sacchetti, 2003). Il secondo minerale presente nella frutta in ordine di importanza e' il Ca, sempre presente nelle strutture pectiche. Il Ca e' presente nei frutti in concentrazioni comprese tra poche unita' e 50 mg/100g nel caso di lamponi e ribes nero (Cabras e Martelli, 2004). Questo elemento e' importante per il mantenimento della struttura ossea e dentaria ed e' richiesto per la contrazione muscolare e l'attivita' enzimatica. Un'adeguata assunzione di Ca e' associata con la riduzione del rischio di ipertensione e cancro colorettale (Sacchetti, 2003). Nei frutti il contenuto in P risulta di 30-40 mg/100g di prodotto per ribes, more, avocado, 50 mg per i lamponi. Il frutto con contenuto piu' elevato di P e' il kiwi con 70 mg/100g. Melanzane e pomodori contengano una quantita' di Fe molto bassa, meno di 0,3 mg/100g. Quasi tutti gli altri frutti si mantengono comunque al di sotto di 1 mg/100g di prodotto con pochissime eccezioni come la mora (1,6 mg). Altri elementi importanti per la salute presenti nei frutti sono il Mg e lo Zn. Per cio' che riguarda il Na, il cui contenuto nella dieta e' generalmente associato al rischio di ipertensione arteriosa, i frutti ne sono molto poveri, con valori inferiori ai 20 mg/100g di prodotto (Cabras e Martelli, 2004).

I composti antiossidanti comprendono una vasta gamma di componenti chimici che, presenti in quantita' limitata rispetto a un substrato ossidabile, ritarda o previene significativamente l'ossidazione di questo substrato. Gli antiossidanti naturali si possono dividere in essenziali, quali alcune vitamine (A, C, E, acido folico) e non essenziali, comprendenti alcuni composti secondari del metabolismo vegetale (polifenoli, glucosinolati, metoxantina, ubiquinone, acido fitico, acido lipoico). Nell'ambito dello studio delle sostanze antiossidanti naturalmente presenti negli alimenti, e' necessario porre l'attenzione sul complesso di fattori che influenzano il livello di questi componenti, di cui la funzionalita' nei riguardi della salute e' sempre piu' studiata. Gli antiossidanti

sono oggi di primario interesse nel campo della ricerca scientifica in quanto molte di queste molecole hanno mostrato effetti protettivi nei confronti del danno cellulare determinato dai radicali liberi e quindi un effetto chemo-preventivo nei confronti del rischi associato a diverse malattie dell'uomo. Studi mirati alla determinazione del reale effetto chemo-preventivo hanno evidenziato come alcuni antiossidanti, assunti nella forma di supplemento dietetico, possano determinare effetti controversi. Sulla base di queste indicazioni e' plausibile che gli effetti benefici determinati dal consumo di prodotti frutticoli, come del resto altri vegetali, siano determinati dalla presenza di una miscela di composti antiossidanti che svolgono un'attivita' sinergica tra di loro, conferendo al prodotto un'attivita' antiossidante molto maggiore rispetto alla semplice somma delle attivita' antiossidanti dei singoli composti (Cabras, 2004).

I fitoestrogeni sono sostanze naturali di origine vegetale che possiedono attivita' estrogena. La loro struttura chimica consiste in uno scheletro steranico come tutti gli ormoni steroidei. Quella dei fitoestrogeni e' una vasta famiglia di composti che si puo' dividere essenzialmente in isoflavoni, lignani e cumestrani. La fonte principale di isoflavoni e' la soia, i lignani si trovano nel lino, segale, cereali in granella, carote, spinaci, broccoli, cavolfiore, fragole e frutti di bosco, i cumestrani si trovano nei fagioli e nei germogli di soia. La maggior parte dei fitoestrogeni viene introdotta attraverso la dieta come composti inattivi che vengono poi convertiti nel tratto gastrointestinale in composti con una struttura steroidea simile agli estrogeni. I fitoestrogeni sembrano concorrere nell'abbassamento del rischio di cancro alla mammella, di malattie cardiovascolari e anche di cancro alla prostata e coloretale. Alcuni fitoestrogeni (isoflavoni) possiedono inoltre una certa attivita' antiossidante.

La fibra dietetica e' definita come l'insieme delle sostanze di origine vegetale che e' resistente nei confronti degli enzimi digestivi dell'organismo umano ed è divisa in due gruppi in base alla sua solubilità. La fibra insolubile è costituita da cellulosa, lignina e in parte dall'emicellulosa. La fibra solubile è costituita da parte dell'emicellulosa, gomme, mucillaggini e pectine. La fibra dietetica solubile, incluse le pectine, determina un abbassamento del livello del colesterolo

nell'organismo umano, anche se studi mirati alla quantificazione di questo abbassamento hanno fornito risultati molto variabili. La fibra vegetale assunta attraverso il cibo sembra anche svolgere un effetto protettivo nei confronti del cancro coloretale. Un ulteriore beneficio salutistico promosso dalla fibra dietetica consiste nel contributo al mantenimento del peso corporeo. Essa infatti aumenta la sazietà e rallenta lo svuotamento gastrico determinando una riduzione dell'apporto calorico. Il contenuto di fibra nei frutti è quasi nullo nei succhi in genere e nel cocomero fino ai frutti di bosco che ne contengono 8 g/100g di peso fresco (Cabras e Martelli, 2004).

Valutazione sensoriale

L'analisi sensoriale di un alimento comprende una parte visiva, una parte olfattiva e una parte gustativa.

La valutazione visiva di un frutto comprende la misura, la forma, il colore, la lucentezza, l'assenza di difetti e di senescenza. I composti responsabili del colore della buccia e della polpa sono i pigmenti. Questi subiscono molte trasformazioni durante la maturazione del frutto, che causano continui cambiamenti nel colore. La mutazione cromatica più evidente è l'invaiaitura, fase fenologica della maturazione dei frutti in corrispondenza della quale avviene il viraggio di colore dell'epicarpo. L'invaiaitura è fondamentalmente associata al metabolismo della clorofilla. Prima di questa fase la colorazione dell'epicarpo è determinata dalla clorofilla che maschera gli altri pigmenti presenti. La scomparsa del pigmento verde si accompagna, secondo le specie, a un accumulo di carotenoidi e/o antociani che aumenta fino alla maturità. La prevalenza di uno di questi pigmenti determina il viraggio. I carotenoidi sono infatti responsabili delle colorazioni variabili dal giallo al rosso-arancio, mentre gli antociani conferiscono le colorazioni che vanno dal rosso al blu (Kader, 2002). La lucentezza del frutto è dovuta alla pruina, una sostanza di consistenza cerosa che viene prodotta dalle cellule superficiali dell'epidermide di frutti e foglie. Ha funzione protettiva dai raggi ultravioletti e impedisce l'eccessiva disidratazione. I difetti nell'aspetto di un frutto possono avere un'origine biotica (insetti, uccelli,

malattie causate da microrganismi), abiotica (grandine, trattamenti chimici, errori durante conservazione dei frutti) o avere un'origine fisiologica (batteratura, crosta, color ruggine). Tali difetti possono subentrare sia prima che dopo la raccolta (Snowdon, 1990).

Gli odori che percepiamo sono prodotti dalle molecole volatili che vengono in contatto con le cellule della mucosa olfattiva poste nella parte superiore interna della cavità nasale. Questi recettori, che si trovano in numero variabile tra 10 e 20 milioni, traducono l'informazione chimica in un impulso nervoso che arriva al sistema limbico, all'ipotalamo, all'amigdala e alla corteccia olfattiva primaria dove vengono interpretati i segnali olfattivi. I recettori hanno una elevata sensibilità discriminativa che arriva a distinguere 10.000 diversi odori. Per ogni sostanza odorosa esiste una soglia di percezione, la concentrazione minima a partire dalla quale il 50% degli individui ne riconosce la presenza. Per alcune sostanze il nostro naso risulta essere 10-100 volte più accurato dei più potenti mezzi di analisi elettronici. Le molecole odorose si spostano insieme all'aria che raggiunge la mucosa olfattiva grazie all'inspirazione. L'aria scaldata e umidificata viene quindi in contatto con la zona sensibile. Esiste un'altra via d'accesso alla zona sensibile, quella retronasale. La bocca è infatti collegata alle cavità nasali in modo che le molecole odorose liberate dagli alimenti durante la masticazione possono risalire andando a stimolare le cellule olfattive. Da queste diverse vie d'accesso alla mucosa olfattiva deriva la distinzione dell'odore in profumo e aroma. Il profumo è la percezione olfattiva di molecole provenienti dall'esterno, l'aroma proviene dalla bocca attraverso la via retronasale. La distinzione è importante perché spesso il profumo e l'aroma di un alimento presentano importanti differenze. Nei frutti l'odore dipende dalla concentrazione nella polpa di molecole volatili odorose. Le molecole volatili sono presenti in concentrazioni estremamente basse, circa 100 µg/g di peso fresco. La molecola volatile più sintetizzata dalla pianta è l'etilene, il cui C costituisce il 50-70% del C delle molecole volatili totali. L'etilene non ha un odore intenso e non contribuisce al tipico sentore olfattivo dei frutti. I composti volatili sono molecole scarsamente idrofile e a basso peso molecolare. Sono costituiti soprattutto da esteri, alcoli,

acidi, aldeidi e chetoni. I difetti olfattivi o retrogusto derivano dall'accumulo di metaboliti fermentativi come l'acetaldeide, l'etanolo, l'etilacetato. Nei frutti è stato identificato un numero notevole di composti volatili, tuttavia solo una parte è importante per la determinazione dell'odore (Eskin, 1991). L'importanza relativa di queste molecole dipende dalla loro soglia di percezione, che può essere più bassa di 1ppb, dalla loro intensità e dalla loro interazione con altri composti (Kader, 2002).

Durante l'assaggio sono coinvolte sia le percezioni tattili (consistenza e astringenza), oltre a quelle gustative (sapore) e olfattive (aroma). La consistenza include caratteristiche come la compattezza, la croccantezza, la succosità e la farinosità. Queste sono influenzate soprattutto dalla qualità dei carboidrati del frutto. La parete cellulare dell'epicarpo e del mesocarpo è costituita da cellulosa, emicellulosa e pectina. Durante la maturazione questi polimeri vengono degradati in parti più piccole e solubili. Questa trasformazione, controllata soprattutto da pectinasi e poligalatturonasi, è responsabile dell'ammorbidimento del frutto durante la maturazione (Kader, 2002). I tannini oligomeri sono invece responsabili di una particolare sensazione a livello della bocca, l'astringenza. Questa consiste in un'impressione di secchezza e rugosità sulla lingua dovuta alla reazione dei polifenoli con la mucina, glicoproteina presente nei secreti mucosi responsabile del loro effetto lubrificante. I tannini dell'epicarpo hanno la capacità di legarsi alle proteine, ma durante la maturazione vengono progressivamente inattivati perdendo la loro aggressività e astringenza (Ribèreau-Gayon et al, 1998).

Il sapore viene percepito dai calici gustativi, recettori presenti soprattutto nelle papille gustative della lingua, ma anche nel palato molle, nella faringe, nelle guance e nell'epiglottide. Il compito delle papille gustative è di analizzare la natura delle varie sostanze presenti nel cibo dopo che sono state disciolte nella saliva. Il contatto con differenti sostanze genera impulsi diversi che raggiungono il cervello, dove vengono percepiti e riconosciuti i sapori. La nostra sensibilità gustativa ci permette di percepire il sapore dolce, amaro, acido, umami (indica il sapore del glutammato, amminoacido particolarmente presente in cibi come

carne e formaggio) e salato. La dolcezza dei frutti dipende dai tipi di zuccheri presenti e dalla loro concentrazione relativa. Il fruttosio infatti è più dolce del saccarosio che a sua volta è più dolce del glucosio. L'acidità dipende dai tipi di acidi organici nel frutto, dalla loro quantità relativa e dal loro potere tampone. Generalmente durante la maturazione gli acidi organici vengono metabolizzati e l'acidità dei frutti diminuisce (Eskin, 1991; Kader, 1992; Seymour et al, 1993; Kader, 2002). Il gusto amaro dipende dal contenuto fenolico, in particolare dagli antociani e dai tannini oligomeri (Lea, 1992).

Il consumatore considera di buona qualità i frutti di bell'aspetto, compatti e con un buon aroma e sapore. Il primo acquisto si basa sulle qualità visive e sulla consistenza al tatto. Torna poi ad acquistare lo stesso tipo di prodotto se è soddisfatto dalle altre qualità sensoriali. Al contrario i produttori e i commercianti sono interessati maggiormente alla qualità estetica e alla consistenza insieme a una lunga postharvest life. Sarebbe auspicabile che questi facessero più attenzione all'aroma, al sapore e al valore nutrizionale dei prodotti agricoli. Favorire questi aspetti della qualità d'altra parte significa coltivare varietà meno resistenti meccanicamente e spostare il periodo di raccolta verso quello della maturità effettiva. Questo implica la gestione di frutti più delicati e una shelf life limitata. La conseguenza è un costo di gestione e delle perdite maggiori. Il consumatore dunque dovrebbe essere disposto a pagare un prezzo superiore per consumare prodotti agricoli con un'alta qualità olfattiva, gustativa e nutrizionale (Shewfelt, 1999; Kader, 2002).

2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questa tesi è di ottenere nuovi elementi per valutare se l'utilizzo di funghi AM in agricoltura e una gestione agronomica che tenda a favorirne lo sviluppo siano un valido strumento per aumentare la qualità degli alimenti. A tale scopo sono state coltivate piante di pomodoro micorrizate e non micorrizate. I frutti dei due tipi di pianta sono stati analizzati e confrontati relativamente ad alcuni aspetti legati alla qualità.

Questo studio si inserisce in una tendenza della ricerca in campo agronomico che è quella di comprendere i fattori che determinano la qualità dei prodotti agroalimentari e trovare sistemi per aumentarla. Le micorrize possono diventare un efficace, sostenibile ed economico strumento in questo senso. Le ricerche svolte sugli effetti della simbiosi AM sulla pianta hanno dimostrato infatti che la parte aerea delle piante micorrizzate hanno un contenuto maggiore di alcuni elementi (P, N, Zn e Na). Anche la quantità di molti composti secondari sembra essere superiore nelle piante micorrizzate, in particolare polifenoli, carotenoidi, terpeni e la produzione di oli essenziali in piante aromatiche. I frutti di piante colonizzate da funghi AM hanno un maggior contenuto di alcuni elementi (P e Zn) e di carotenoidi.

Per questo lavoro sono stati coltivati in vaso piante di pomodoro *Money Maker* su terreno sterile e le stesse varietà di pomodoro su terreno sterile inoculato con spore di funghi AM della specie *Glomus intraradices*. Tutte le piante sono state irrigate con soluzione nutritiva contenente una dose ridotta di P.

Alcuni elementi (C, P, K, Ca, Na, S, Fe, Mg, Zn) delle foglie delle piante adulte micorrizzate e non micorrizzate sono stati quantificati allo scopo di valutare lo stato nutrizionale delle due piante.

Quando i frutti dei due tipi di pomodoro sono giunti a maturazione sono stati analizzati e confrontati relativamente ad alcuni aspetti legati alle tre componenti della qualità: il contenuto nutrizionale, le caratteristiche sensoriali e la sicurezza d'uso.

Per quanto riguarda il contenuto nutrizionale e le caratteristiche sensoriali sono stati presi in considerazione il pH, l'acidità titolabile e il contenuto di solidi solubili dei frutti di entrambi i tipi di pianta. Sono state inoltre quantificate e confrontate alcune delle componenti bioattive più importanti dei frutti: i principali elementi (C, P, K, Ca, Na, S, Fe, Mg, Zn), il contenuto di licopene, di polifenoli totali, di acido ascorbico e glutazione ridotti e ossidati, e l'attività antiossidante della frazione idrofila e lipofila. Relativamente alla sicurezza d'uso sono stati eseguiti test di mutagenesi in vitro. Questi avevano lo scopo di valutare se gli estratti idrofili e lipofili dei frutti di piante micorrizzate hanno, rispetto a quelli dei frutti di piante

creciute senza micorrizzazione, una maggior tendenza a indurre modificazioni all'interno della sequenza nucleotidica o della struttura a doppia elica del DNA di un organismo vivente.

3. MATERIALI E METODI

Le piante micorrizzate della varietà di pomodoro Money Maker sono state ottenute mediante inoculazione con terreno proveniente da pot-cultures del fungo arbuscolare *Glomus intraradices*, contenente radici micorrizzate, micelio e spore. I pomodori sono stati seminati in vasetti da 100 ml contenente l'inoculo descritto, e le piante sono state successivamente trapiantate in vasi da L 3,5 contenenti un substrato costituito da terreno di campo, sterilizzato in autoclave, miscelato a Terragreen (argilla "calcinata") 1:1 in volume.

Le piante non micorrizzate sono state ottenute allo stesso modo, ma la semina è stata effettuata in terreno precedentemente sterilizzato in autoclave.

Al momento del trapianto, avvenuto a un mese circa dall'emergenza, le piante sono state analizzate per confermare la presenza e assenza di micorrize. Dieci piante micorrizzate e 10 di controllo sono state allevate in vaso per circa 4 mesi, fino al termine del ciclo di produzione. Tutte le piante erano irrigate con soluzione nutritiva, contenente una dose ridotta di fosforo.

Analisi del contenuto minerale

Lasciar disidratare foglie e frutti di pomodori a 60°C per una settimana, quindi ridurli in polvere.

Aggiungere una soluzione di ac. nitrico e ac. perclorico, e lasciar agire per 12h a 120°C. Quindi aggiungere acqua bidistillata.

Determinare il contenuto di C e N con *Finnigan Flash E1112 CHN-S elemental analyzer* (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA).

Determinare il contenuto di Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S, Zn con *Optima 2000 OES DV ICP-OES* (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Misurazione del pH e acidità titolabile

Omogenizzare del pomodoro e filtrare l'omogenato.

Misurare il pH del filtrato con un pHmetro.

Omogenizzare una quantità nota di pomodoro e filtrare l'omogenato.

Aggiungere dell'acqua distillata.

Titolare i campioni con NaOH fino a ottenere un pH di 8,2-8,4.

L'acidità viene espressa considerando l'acido predominante della specie analizzata. Nel caso del pomodoro è l'ac. malico: $\text{Ac. malico} = 134,09 \text{ MW(?) / 2 eq} = 67.5$

Calcolo dell'acidità: $\text{Acidità\%} = \text{mL (di NaOH usati)} \cdot 0,1\text{N (NaOH)} \cdot \text{fattore millequivalente} \cdot 100 / \text{g (di estratto)}$.

Misurazione del contenuto di solidi solubili

Calibrare lo strumento a 0°Brix utilizzando acqua distillata.

Depositare una goccia di estratto di pomodoro e procedere nella lettura.

Leggere la temperatura nel termometro del rifrattometro ed eventualmente correggere il valore letto utilizzando l'apposita tabella allegata allo strumento.

Determinazione del contenuto di licopene

L'analisi (Beerh e Siddappa, 1959; Adsule e Dann, 1979) si basa sulla lettura spettrofotometrica dell'estratto alla lunghezza d'onda del licopene e calcolandone la quantità utilizzando l'equazione di Lambert-Beer.

Omogenizzare del pomodoro con un solvente di estrazione (costituito da BHT (*butil idrossi toluene*), *acetone*, *esano* e *metanolo*).

Lasciare in agitazione per 15min, aggiungere dell'acqua distillata e lasciare in agitazione per altri 5 min.

Recuperare la fase apolare e misurarne l'Abs a 503nm.

Calcolare la quantità di licopene utilizzando l'equazione di Lambert-Beer:

$$C = \text{Abs} / (\epsilon \cdot l)$$

$$\text{mg/ g (licopene/ pomodoro)} = (\text{Abs} \cdot \text{PM (licopene)} \cdot 10^{-3} \cdot V (\text{di diluizione}) \cdot 2 (\text{da } 0,5\text{g a } 1\text{g})) / (\epsilon \cdot l).$$

$$\text{mg/ g (licopene/ pomodoro)} = (\text{Abs} \cdot 536,89 \cdot 10^{-3} \cdot 23 \cdot 2) / (17,2 \cdot 104 \cdot 1 \cdot 23).$$

Determinazione del contenuto di polifenoli totali.

La determinazione dei fenoli totali nei campioni utilizza il metodo descritto da Singleton et al (1999). Questo metodo prevede l'uso del reagente Folin-Ciocalteu. Il reagente Folin-Ciocalteu è formato da due complessi acidi: il fosfomolibdeno e il fosfotungsteno. La reazione fra il Folin-Ciocalteu e i fenoli avviene a un pH di circa 10. Tale condizione di basicità è ottenuta mediante una soluzione di Na_2CO_3 . In queste condizioni i fenoli sono dissociati ad anione fenolato e sono in grado di ridurre il Folin-Ciocalteu che si colora di blu. L'intensità di questa colorazione viene misurata allo spettrofotometro.

Il metodo si basa sulla comparazione tra l'intensità della colorazione del campione e quella esibita da soluzioni con concentrazioni note di polifenoli in una curva dose-risposta.

Omogenizzare del pomodoro aggiungendo MeOH e mettere in agitazione.

Centrifugare e recuperare il surnatante.

Preparare due tubi con H_2O , reagente Folin-Ciocalteu e Na_2CO_3 . In un tubo aggiungere anche l'estratto da testare.

Attendere 90min, tarare lo spettrofotometro col bianco alla lunghezza d'onda di 760 nm. Leggere quindi l'Abs del campione di pomodoro.

Contenuto di ascorbato ridotto, ossidato e totale

L'analisi (Kampfenkel e al,1995; Gillespie e al, 2007) si basa sulla riduzione del Fe^{3+} a Fe^{2+} da parte dell'acido ascorbico (AsA) a cui fa seguito la determinazione spettrofotometrica dello ione Fe^{2+} complessato con 2, 2'-dipiridile.

L'acido deidroascorbico (DasA) è ridotto a AsA mediante incubazione con DTT (ditiotreitolo).

La determinazione dell'ac. ascorbico totale avviene previa rimozione dell'eccesso di DTT con NEM (N-etilmaleimide).

La concentrazione di DasA è poi calcolata dalla differenza di AsA totale e AsA senza pretrattamento con DTT.

Omogenizzare del pomodoro, aggiungere del TCA e attendere 15 min.

Centrifugare e recuperare il surnatante.

Preparazione dei campioni per l'analisi dell'ascorbato ridotto

Unire in due eppendorf: *buffer fosfato*, *TCA*, *ac.fosforico*, *2,2dipiridile*, *cloruro ferrico* e *acqua bidistillata*.

In una di queste si aggiungerà anche una parte del surnatante recuperato.

Preparazione per l'ascorbato totale

Unire in due eppendorf *DTT* e *buffer fosfato*.

In una eppendorf aggiungere il surnatante recuperato, nell'altra del *TCA*.

Mescolare e incubare in bagno termostatico per 20 min.

Aggiungere in entrambe *NEM*, *ac.fosforico*, *2,2dipiridile* e *cloruro ferrico*.

Incubare tutte e quattro le eppendorf per 40 min.

Impostare lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 525nm.

Tarare lo strumento con i bianchi ed effettuare la lettura dei campioni.

Si calcola la quantità di *ac. ascorbico ridotto* e *totale* per g di pomodoro confrontando i valori ottenuti con la retta di taratura:

$$\text{Abs} : X (\mu\text{g/ mL}) = \text{Abs (retta di tar)} : \mu\text{g/ mL (retta di tar)}$$

$$\text{mg/ 100g} = (\mu\text{g/ mL} \cdot 2 \cdot 100) / 0.5(\text{g}) \cdot 1.000.$$

Determinazione del glutathione ridotto e ossidato

La determinazione del *glutathione* (Brehe e Burch, 1976; Griffith, 1980; Anderson, 1985) avviene per mezzo di una procedura in cui la molecola viene ciclicamente ossidata dal *DTNB* (*acido 5',5'-ditiobis-nitrobenzoico*) e ridotta dal *NADPH* in presenza dell'enzima *glutathione reduttasi*.

Il tasso di *TNB* (*acido 2-nitro-5-tiobenzoico*) che si forma nel tempo è monitorata da una lettura spettrofotometrica a un'assorbanza di 412nm e la quantità presente nel campione è proporzionale alla somma di *GSH* e *GSSG* presente.

La determinazione del *glutathione ossidato* (GSSG) avviene seguendo lo stesso principio previa derivatizzazione del *glutathione ridotto* (GSH) con 2-vinilpiridina. In questo modo alle reazioni di riduzione con DTNB parteciperà solo il *glutathione ossidato*.

Omogenizzare del pomodoro aggiungendo *acido meta-fosforico* e EDTA-K₂, centrifugare e recuperare il surnatante.

Determinazione del *glutathione totale*

Preparare la miscela di reazione aggiungendo: estratto, K₂HPO₄, *reagenteA* (*buffer K-fosfato*, EDTA-K₂ e DTNB e BSA) e *reagenteB* (EDTA, *buffer imidazolo-HCl*, BSA e *glutathione riduttasi*).

Si attendono 2 min. e si immerge la miscela in acqua a 90°C per arrestare la reazione enzimatica. Quindi leggere l'assorbanza a 412nm.

Si calcola la quantità di *glutathione totale* utilizzando la retta di taratura:

$$\text{Abs} : X (\mu\text{g/ mL}) = \text{Abs (retta di tar)} : \mu\text{g/ mL (retta di tar)}$$

Determinazione del *glutathione ossidato*

Aggiungere all'estratto *trietanolamina* e 2-vinilpiridina e mantenere in incubazione per 1h.

Gli estratti così trattati sono utilizzati nella miscela di reazione preparata secondo lo schema descritto precedentemente.

Determinazione del *glutathione ridotto*

Il *glutathione ridotto* è determinato per differenza tra il *glutathione totale* e *ossidato*.

Determinazione dell'attività antiossidante col metodo ABTS/persolfato

Questa metodologia (Re e al.,1999; Cano e al., 2003) consente di misurare l'attività antiossidante di estratti vegetali, sia nella frazione idrofila che lipofila, mediante l'impiego del catione radicale ABTS^{•+} generato attraverso una reazione chimica di ossidazione ottenuta facendo reagire la molecola di ABTS con persolfato di potassio.

Il metodo si basa sulla comparazione tra la capacità dell'estratto di ridurre il radicale ABTS e quella esibita da antiossidanti standard come l'ac.ascorbico o il Trolox in una curva dose-risposta.

Omogenizzare una quantità nota di pomodoro aggiungendo del *buffer K-fosfato*, centrifugare e recuperare il surnatante (idrofilo).

Sospendere il pellet in *acetato di etile*, lasciare in agitazione, centrifugare e recuperare il surnatante (lipofilo). Far evaporare questa parte di estratto e risospendere il residuo solido ottenuto in una quantità nota di *acetato di etile*.

Diluire la soluzione di $ABTS^{++}$ con *buffer fosfato* ed *etanolo* in modo da ottenere un'assorbanza a 734nm di circa 0,7 perché la lettura sia più attendibile possibile. Registrare l'assorbanza col solo $ABTS^{++}$, quindi aggiungere a ogni cuvetta contenente $ABTS^{++}$ un'aliquota di estratto idrofilo o lipofilo e leggere l'assorbanza di ogni cuvetta dopo 60 min.

Si calcola la capacità antiossidante dei campioni esaminati confrontando l'assorbanza con quelle della retta di taratura.

Preparazione della sostanza da testare per le analisi di mutagenesi

Omogenizzare una quantità nota di pomodoro, aggiungere acqua distillata, lasciare in agitazione per mezz'ora, centrifugare e recuperare il surnatante (idrofilo).

Sospendere il pellet in *etil acetato*, agitare per mezz'ora e prelevare il surnatante (lipofilo).

Portare a secco i due estratti, pesare la rimanenza solida e risospenderla in una quantità nota di acqua distillata per l'idrofilo e *DMSO* per il lipofilo.

Valutazione della genotossicità puntiforme (test di Ames)

Queste analisi (Mortelmans e Zeiger, 2000) prevedono l'utilizzo di una serie ceppi di batteri di *Salmonella typhimurium istidina* dipendenti, ognuno con differenti tipi di mutazione puntiforme nei geni dell'operone per la sintesi di tale amminoacido.

Quando questi ceppi vengono coltivati su un terreno contenente *istidina* in tracce, solo i batteri con mutazioni (reversioni) in grado di ripristinare la capacità di sintetizzare *istidina* possono formare colonie.

Contando le colonie cresciute in presenza di una sostanza rispetto a quelle cresciute senza dunque, non solo otteniamo un indice della mutagenicità della sostanza stessa, ma possiamo conoscere il meccanismo di azione in base a quali ceppi hanno subito tali mutazioni.

Alcune sostanze chimiche diventano mutagene solo dopo essere state opportunamente metabolizzate all'interno della cellula. Dunque ogni prova deve essere ripetuta aggiungendo alla sostanza da testare dell'*S9mix*, un pool di enzimi epatici e cofattori.

Preparare delle piastre petri con un terreno di coltura per batteri costituito da *agar*, *glucosio*, *acqua distillata* e *VBS*. In questo terreno è esclusa l'*istidina*.

Inoculare un terreno liquido nutriente (*nutrient broth oxioid*, *acqua distillata* e *ampicillina*) con ceppi di *Salmonella TA98* e un terreno con *Salmonella TA100*.

Mettere a incubare finché la concentrazione delle colture sarà quella ottimale.

Preparare il *top agar* (*agar*, *NaCl*, *acqua distillata* e *istidina/biotina*) e l'*S9mix* (*NAD*, *glucosio-6-fosfato*, *MgCl₂/KCl* ed *S9* (enzimi epatici) e *tampone fosfato*).

Inserire in due tubi del *top agar*, la sostanza la cui attività vogliamo testare e un'aliquota della coltura di uno dei due ceppi di salmonella. In uno di questi tubi inserire anche dell'*S9mix*. Distribuire ogni tubo su una piastra petri.

Ripetere queste operazioni con ognuno dei due ceppi di batteri.

Dopo un'incubazione di 48h le piastre possono essere contate.

Valutazione della genotossicità cromosomica

La valutazione della capacità di una sostanza a provocare mutazioni cromosomiche viene effettuata su colture di cellule eucariotiche, in questo caso linfociti umani, in presenza della sostanza stessa e di *citocalasina-B*, un inibitore della divisione della membrana citoplasmatica. Le cellule sono poi fissate su un vetrino e colorate per essere osservate al microscopio (Mateuca e al., 2006).

La frequenza di cellule binucleate contenenti micronuclei, piccoli corpi extranucleari derivanti da porzioni di dna sfuggiti durante la divisione nucleare, è un indice della genotossicità cromosomica della sostanza testata. Se i nuclei proliferati in presenza di una sostanza hanno generato un'alta frequenza di

micronuclei rispetto a nuclei proliferati in sua assenza, tale sostanza ha la tendenza a provocare mutazioni cromosomiche.

Mettere a incubare del sangue per 24ore.

In alcuni tubi si aggiunge la sostanza la cui attività mutagena vogliamo testare, in altri un mutageno con attività nota, altri tubi vengono lasciati tal quali. Continuare quindi l'incubazione per 20ore.

Aggiungere a tutte le colture della *citocalasina-B* e rimettere a incubare per 28ore.

Centrifugare, eliminare il surnatante, e sospendere il pellet in *soluzione ipotonica, ac. acetico e metanolo*.

Centrifugare, eliminare il surnatante, sospendere in *metanolo*.

Centrifugare, eliminare il surnatante e sospendere il pellet in *metanolo* e *ac. acetico*. Ripetere quest'operazione un'altra volta.

Distribuire in pellet su due vetrini per tubo e colorarli con una soluzione di *Giemsa* e *acqua deionizzata*.

4. RISULTATI

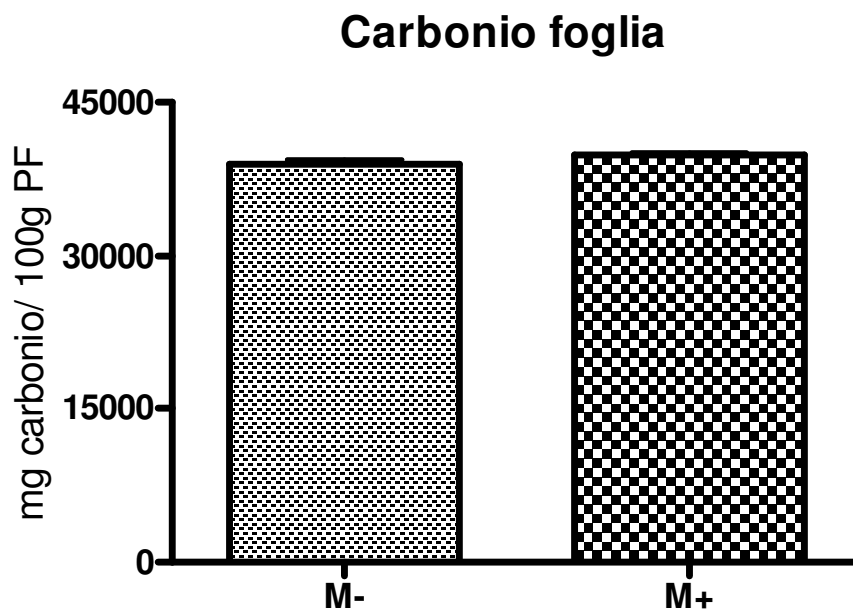
Le piante micorrizate risultano avere un peso secco maggiore rispetto alle piante non micorrizate (Fig. 4.1).

	M-	M+	Significatività
Peso secco (%)	3.16 ± 0.08	4.15 ± 0.14	***

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.1. Peso secco delle piante (% di peso secco/ peso fresco).

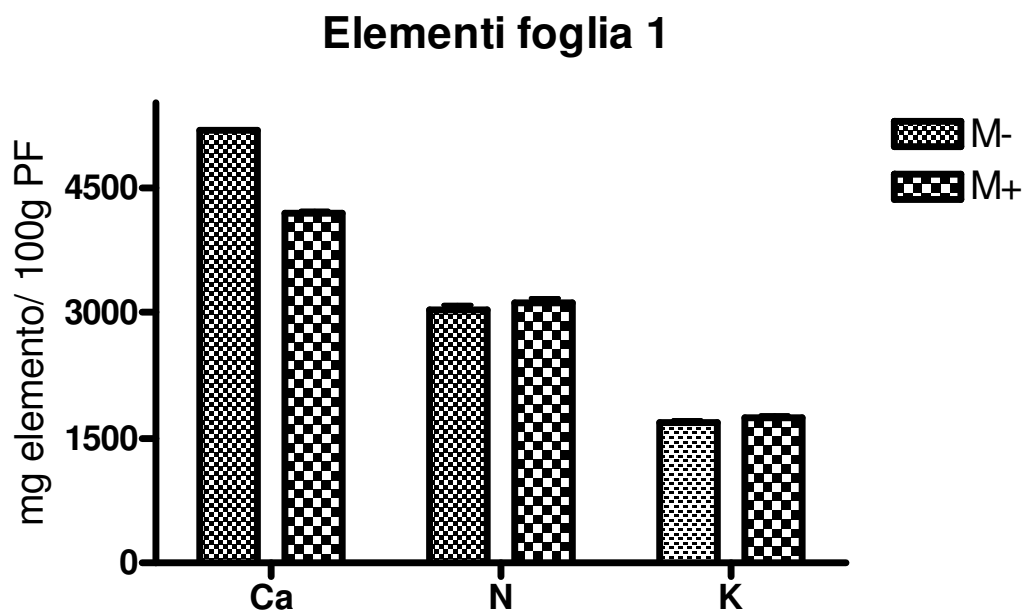
Le foglie delle piante non micorrizate sono di colore verde pallido tendente al giallo a differenza di quelle micorrizate che sono verdi. Le foglie delle piante micorrizate hanno inoltre una concentrazione di P (Fig. 4.4), Zn (Fig. 4.5) e C (Fig. 4.2) significativamente più alta rispetto alle piante non micorrizate. Anche la concentrazione di N è maggiore nelle foglie di piante micorrizate, anche se in modo meno significativo (Fig. 4.3). Per quanto riguarda il Fe, Mn (Fig. 4.5), Ca (Fig. 4.3), Mg e Na (Fig. 4.4) sono le piante non micorrizate ad avere una concentrazione superiore, mentre quella di K (Fig. 4.3) e di S (Fig. 4.4) è molto simile nelle due piante.



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
C	39060 ± 242	39930 ± 244	*

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

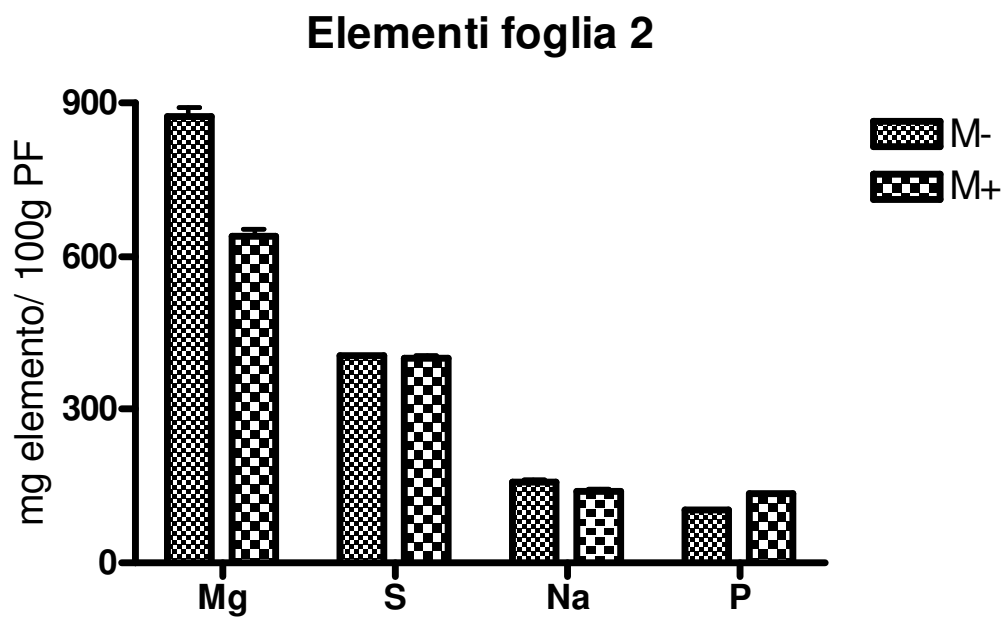
Fig. 4.2. Contenuto di C delle foglie (mg/ 100g peso fresco).



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
Ca	51710 ± 164	41750 ± 436	***
N	3037 ± 43	3120 ± 47	ns
K	1693 ± 29	1733 ± 25	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.3. Contenuto di Ca, N e K delle foglie (mg/ 100g peso fresco).

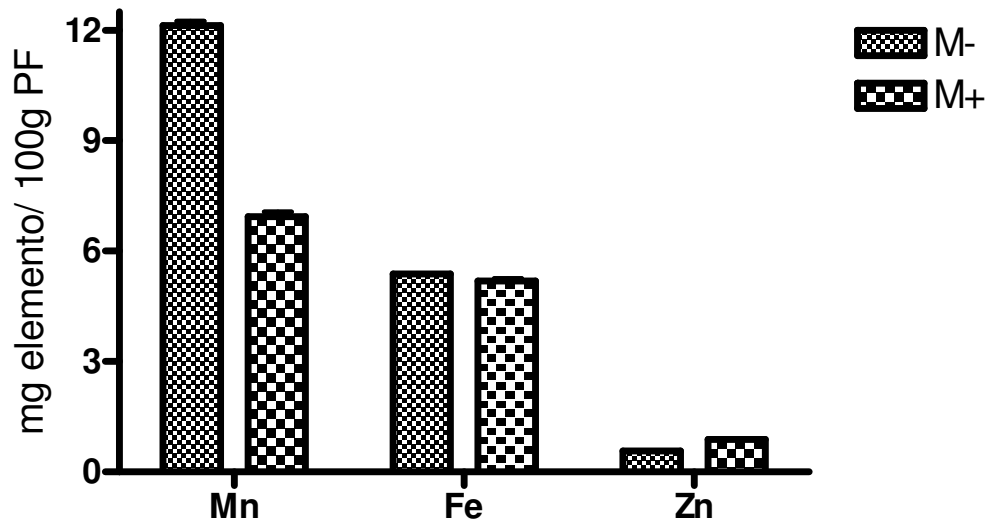


Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
Mg	872.9 ± 17.7	639.3 ± 12.6	***
S	404 ± 3	401 ± 5	ns
Na	157.5 ± 3.5	142.3 ± 2.5	*
P	102.8 ± 1.7	136.1 ± 1.7	***

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.4. Contenuto di Mg, S, Na e P delle foglie (mg/ 100g peso fresco).

Elementi foglia 3



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
Mn	12.140 ± 0.147	6.948 ± 0.105	***
Fe	5.365 ± 0.038	5.229 ± 0.007	*
Zn	0.5518 ± 0.0166	0.8664 ± 0.0221	***

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.5. Contenuto di Mn, Fe e Zn delle foglie (mg/ 100g peso fresco).

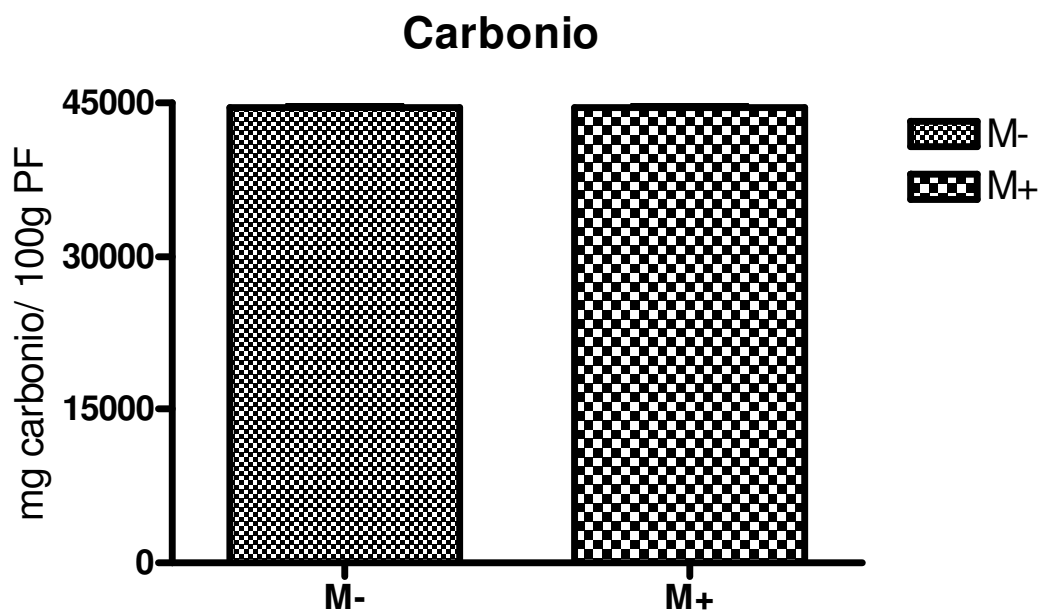
Il calibro e il peso fresco dei frutti sono maggiori nei frutti micorrizzati in modo molto significativo. Per quanto riguarda il peso secco non ci sono differenze significative nei due tipi di frutto (Fig. 4.6).

	M-	M+	Significatività
Calibro (cm)	5.3 ± 0.1	5.7 ± 0.1	**
Peso (g)	73.5 ± 3.6	89.2 ± 4.3	**
Peso secco (%)	4.86 ± 0.09	4.71 ± 0.23	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.6. Calibro (cm), peso (g) e peso secco (% peso secco/ peso fresco) dei frutti.

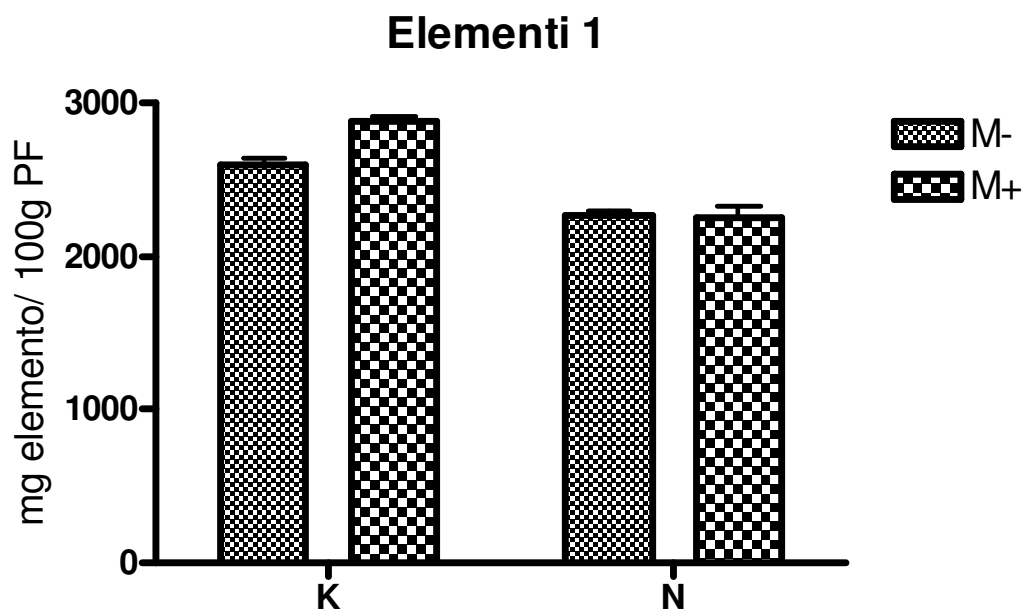
Per quanto riguarda i frutti la concentrazione di nutrienti segue una tendenza simile a quella delle foglie quanto a P (Fig. 4.9) e Zn (Fig. 4.10) che sono superiori nei frutti di pomodori micorrizzati in modo molto significativo. La concentrazione di P nei frutti di piante micorrizzate arriva a essere 1,6 volte quelle dei frutti delle piante senza micorrizzazione. La concentrazione di K (Fig. 4.8) e Ca (Fig. 4.9) diventa superiore nelle piante micorrizzate. Per il Ca la tendenza è opposta a ciò che avviene nelle foglie (Fig. 4.3). La concentrazione di S è nettamente maggiore nei frutti delle piante non micorrizzate (Fig. 4.9), mentre per C (Fig. 4.7), N (Fig. 4.8), Mg, Na (Fig. 4.9), Fe e Mn (Fig. 4.10) non si rilevano differenze.



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
C	44660 ± 170	44560 ± 219	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

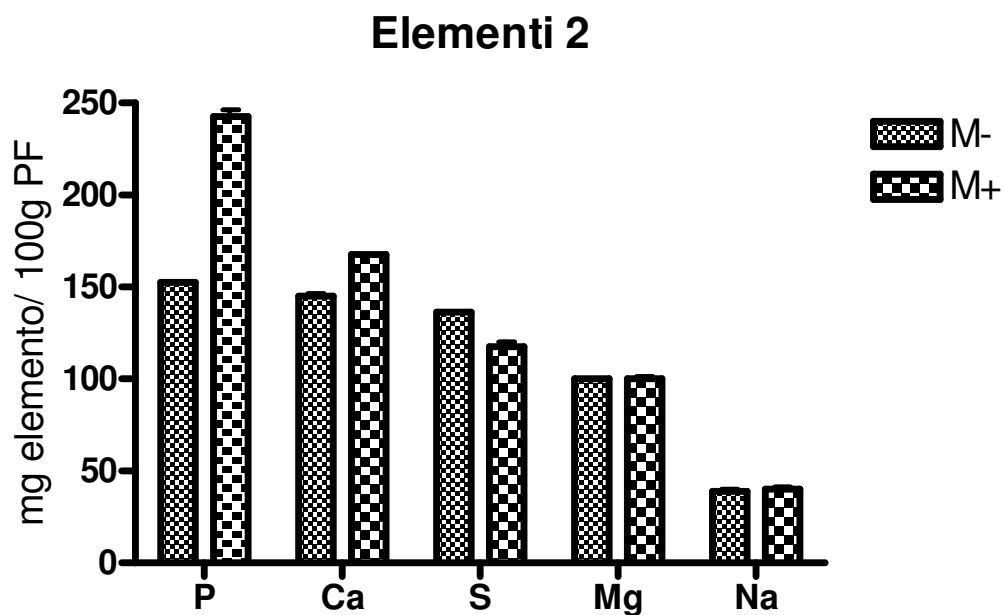
Fig. 4.7. Contenuto di C dei frutti (mg/ 100g peso fresco).



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
K	2597 ± 49	2887 ± 29	**
N	2265 ± 25	2254 ± 76	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

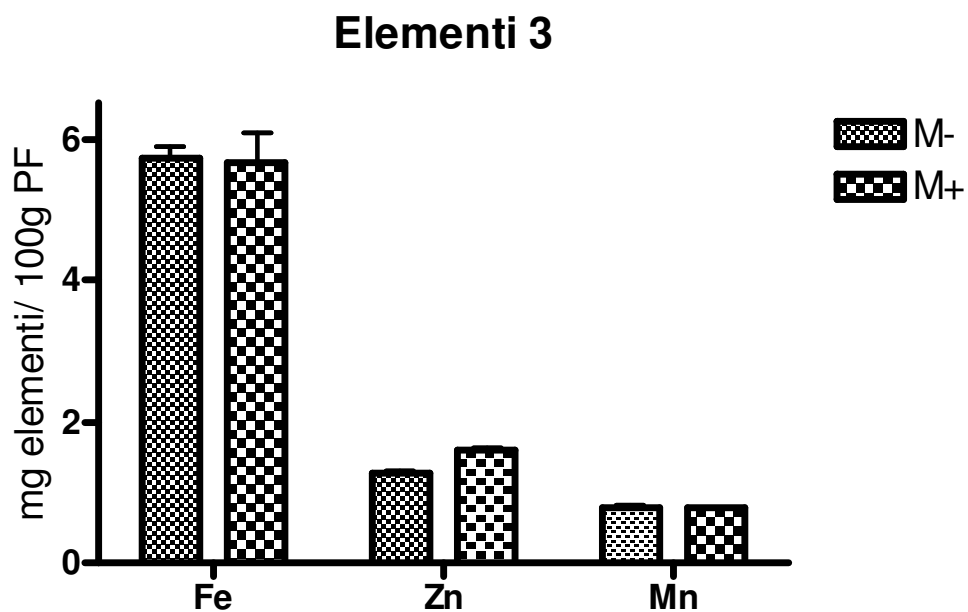
Fig. 4.8. Contenuto di K e N dei frutti (mg/ 100g peso fresco).



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
P	152.5 ± 0.5	243.2 ± 3.3	***
Ca	145.6 ± 1.4	167.4 ± 0.4	***
S	136 ± 1	118 ± 2	***
Mg	100.0 ± 0.7	100.5 ± 0.6	ns
Na	38.36 ± 1.95	39.79 ± 2.24	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.9. Contenuto di P, Ca, S, Mg e Na dei frutti (mg/ 100g peso fresco).



Elemento (mg/ 100g)	M-	M+	Significatività
Fe	5.721 ± 0.155	5.667 ± 0.403	ns
Zn	1.261 ± 0.059	1.609 ± 0.035	**
Mn	0.7986 ± 0.0114	0.7879 ± 0.0088	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.10. Contenuto di Fe, Zn e Mn dei frutti (mg/ 100g peso fresco).

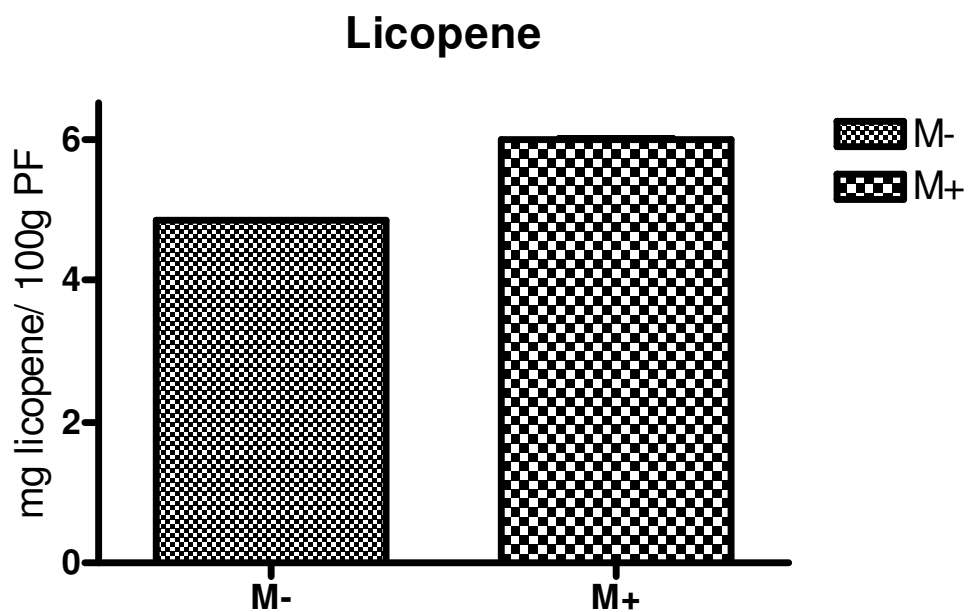
I pH dei due tipi di frutto non hanno differenze significative. Al contrario la quantità di solidi solubili e l'acidità titolabile sono significativamente superiori nei pomodori delle piante non micorrizzate (Fig. 4.11).

	M-	M+	Significatività
pH	4.07 ± 0.01	4.05 ± 0.00	ns
Solidi solubili (°Brix)	4.07 ± 0.11	3.57 ± 0.11	***
Ac.titolabile (% di Ac.citrico)	0.324 ± 0.001	0.316 ± 0.001	**

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.11. pH, solidi solubili (°Brix) e acidità titolabile (% di ac.citrico/ peso fresco) dei frutti.

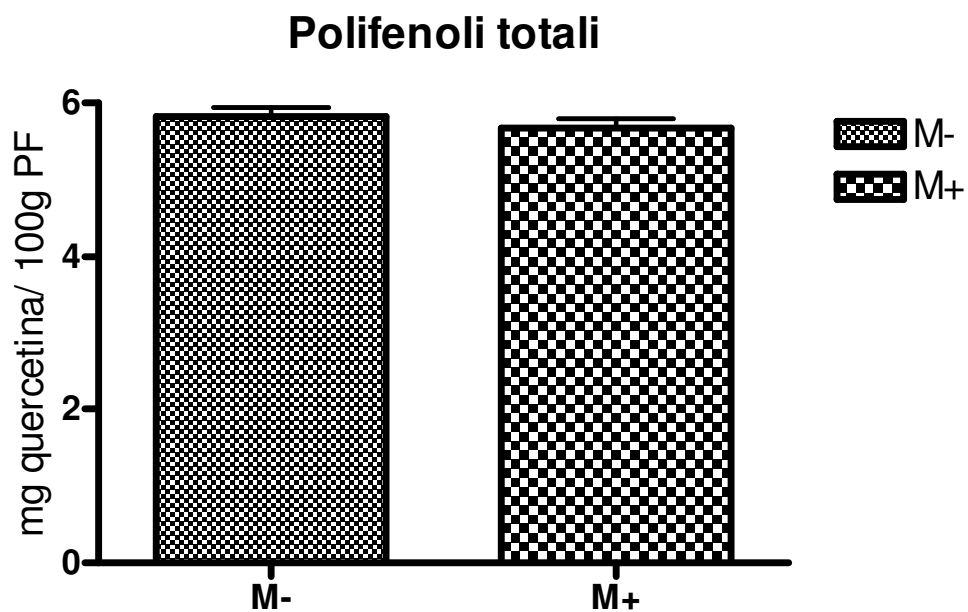
Per quanto riguarda i composti bioattivi i frutti di piante micorrizzate mostrano un contenuto significativamente superiore di licopene (Fig. 4.12). Le quantità nei due tipi di frutto di polifenoli totali (Fig. 4.13), acido ascorbico ridotto e ossidato (Fig. 4.14) e glutathione ridotto e ossidato (Fig. 4.15) non sono significativamente diverse.



	M-	M+	Significatività
Licopene (mg/ 100g)	4.84 ± 0.10	5.99 ± 0.02	**

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

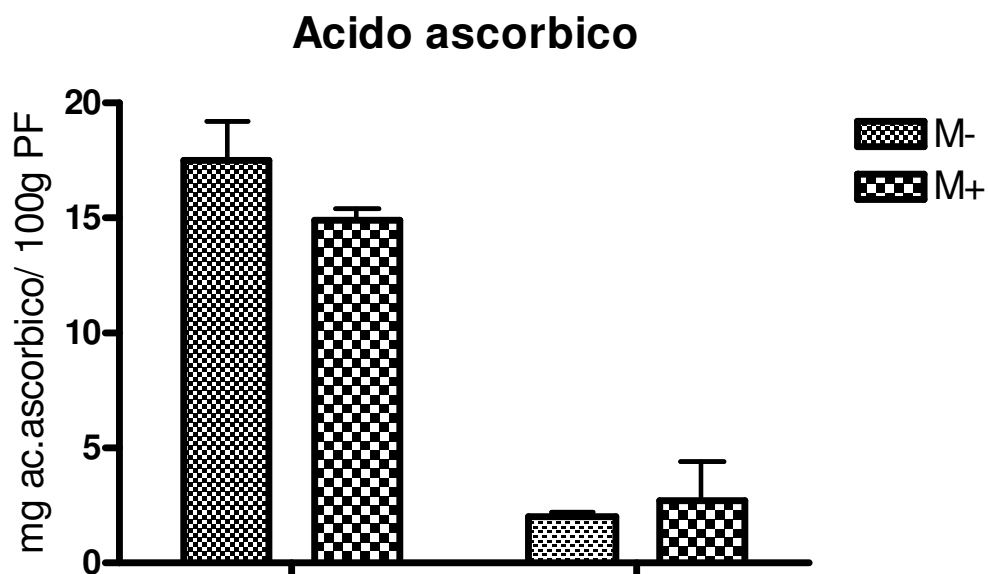
Fig. 4.12. Contenuto di licopene nei frutti (mg/ 100g peso fresco).



	M-	M+	Significatività
Polifenoli totali (mg/ 100g)	5.82 ± 0.13	5.68 ± 0.10	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

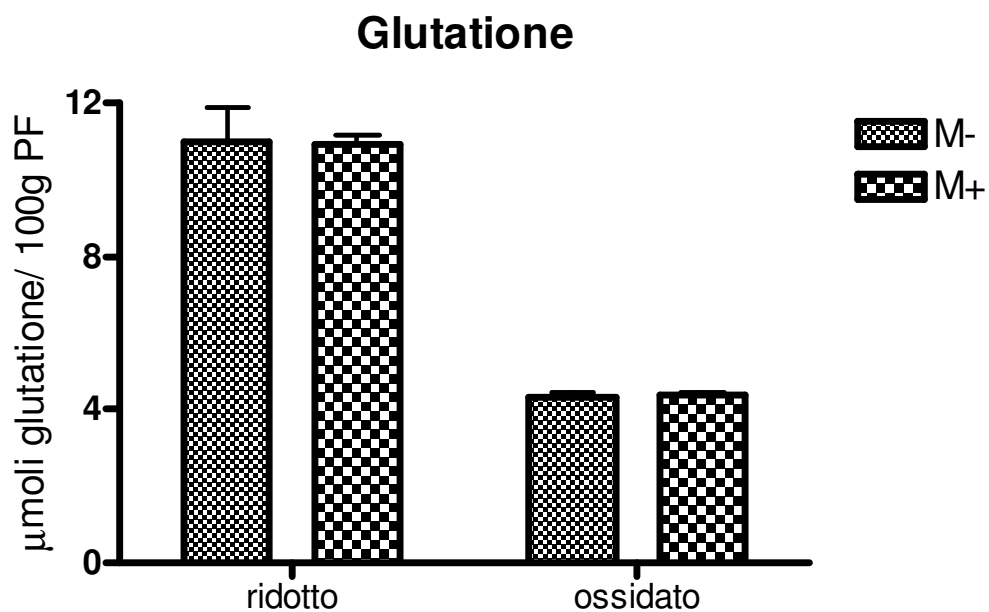
Fig. 4.13. Contenuto di polifenoli totali (mg/ 100g) dei frutti.



Ac. ascorbico (μ moli / 100g)	M-	M+	Significatività
ridotto	17.52 \pm 1.67	14.95 \pm 0.48	ns
ossidato	2.06 \pm 0.11	2.74 \pm 1.65	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.14. Contenuto di acido ascorbico ridotto e ossidato (μ moli / 100g) dei frutti.

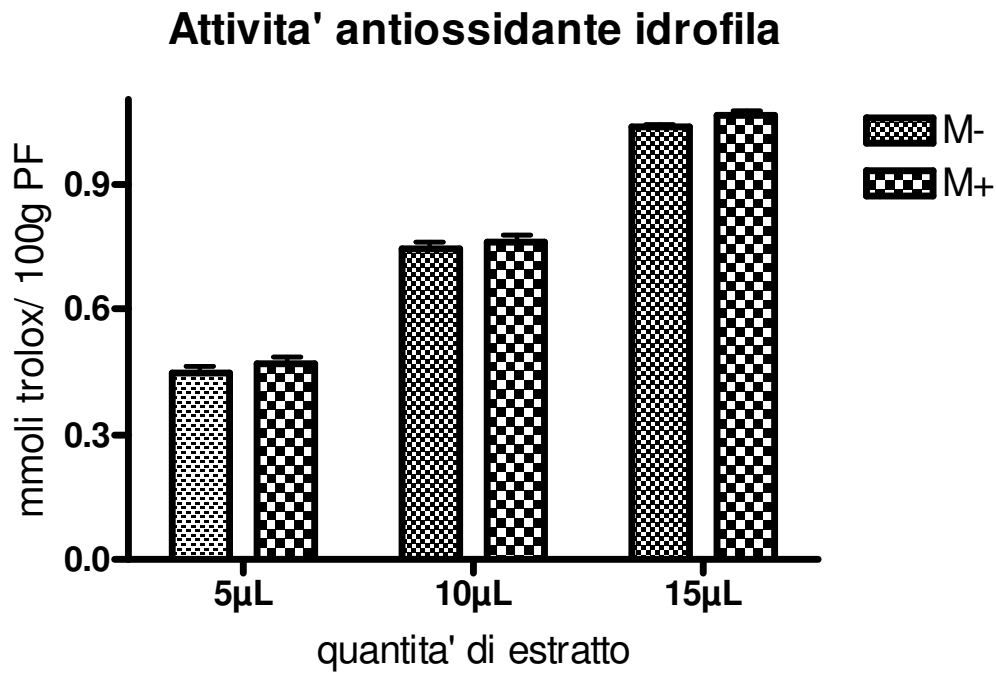


Glutathione (μmoli / 100g)	M-	M+	Significatività
ridotto	11.00 ± 0.89	10.91 ± 0.27	ns
ossidato	4.33 ± 0.13	4.37 ± 0.08	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.15. Contenuto di glutathione ridotto e ossidato (μmoli / 100g) dei frutti.

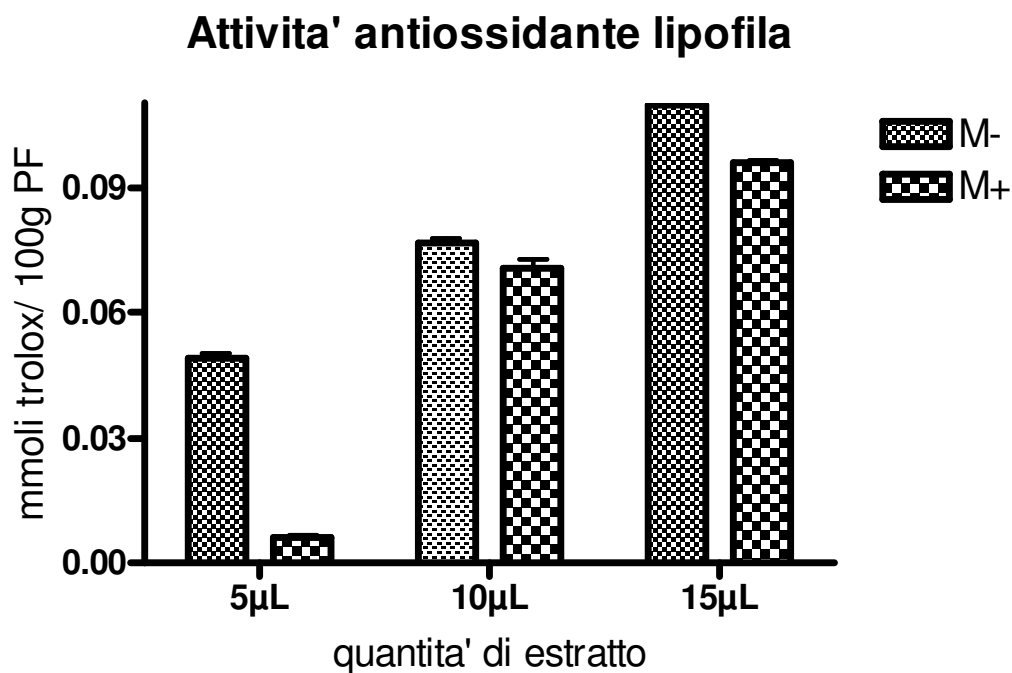
Le frazioni idrofile dei due frutti hanno una capacità di neutralizzare il radicale ABTS^{•+} simile (Fig. 4.16) mentre la frazione lipofila dei pomodori di piante non micorrizate ha una capacità antiossidante leggermente superiore a quella di pomodori di piante micorrizate (Fig. 4.17).



Att. antiox idrofila (mmoli / 100g)	M-	M+	Significatività
5µL	0.45 ± 0.01	0.47 ± 0.02	ns
10µL	0.74 ± 0.02	0.76 ± 0.02	ns
15µL	1.03 ± 0.01	1.06 ± 0.01	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.16. Attività antiossidante (mmoli di trolox / 100g) svolta dalla frazione idrofila dei frutti a tre concentrazioni di estratto.

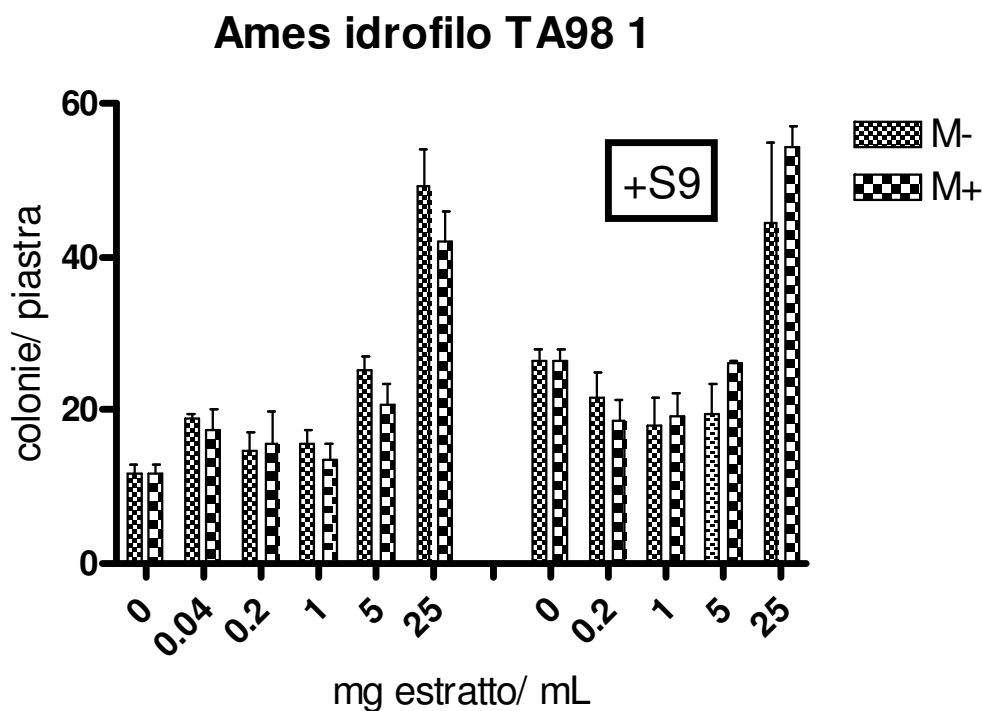


Att. antiox lipofila (mmoli / 100g)	M-	M+	Significatività
5µL	0.049 ± 0.001	0.006 ± 0.000	***
10µL	0.077 ± 0.001	0.071 ± 0.002	*
15µL	0.110 ± 0.000	0.096 ± 0.001	***

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.17. Attività antiossidante (mmoli di trolox / 100g) svolta dalla frazione lipofila dei frutti a tre concentrazioni di estratto.

Per quanto riguarda il test di Ames, nella prima serie di test eseguiti con il ceppo di salmonella TA100 con S9 sulla frazione idrofila alla concentrazione di 1 mg/ mL, i frutti delle piante micorrizate hanno dato una risposta mutagenica maggiore (Fig. 4.20). Nei test eseguiti con il ceppo TA98 sulla frazione lipofila, la concentrazione di 0.15 ha avuto una risposta significativamente più mutagenica l'estratto dei frutti di piante non micorrizate mentre la concentrazione di 2.625 mg/ mL hanno avuto una risposta più mutagenica i frutti delle piante micorrizate (Fig. 4.22). Nei test eseguiti con il ceppo TA100 sulla frazione lipofila alla concentrazione di 0.15 mg/ mL con e senza S9 sono i frutti delle piante non micorrizate ad aver dato risultati mutagenicamente superiori (Fig. 4.23). Il resto delle analisi a tutte le dosi non ha rivelato differenze significative nell'induzione di mutazioni puntiformi da parte dei due tipi di frutti. Alle dosi massime dell'estratto idrofilo l'induzione di mutazione è notevole per entrambi i tipi di pomodoro (Fig. 4.18, 4.19 e 4.21). Tutte le piastre hanno un buon tappeto di crescita batterico.

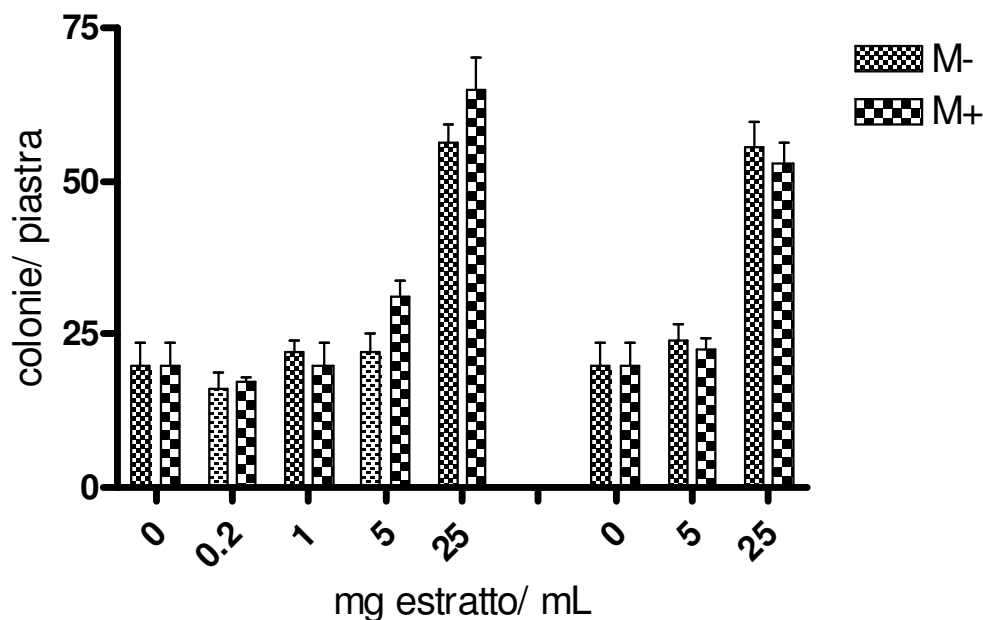


Estratto (mg/ mL)	M- (colonie/ piastra)	M+ (colonie/ piastra)	Significatività
0	11.7 ± 1.3		
0.04	19.0 ± 0.6	17.3 ± 2.9	ns
0.2	14.7 ± 2.3	15.7 ± 4.1	ns
1	15.7 ± 1.9	13.7 ± 2.0	ns
5	25.3 ± 1.8	20.7 ± 2.8	ns
25	49.3 ± 4.7	42.0 ± 4.0	ns
0	26.3 ± 1.7		
0.2	21.7 ± 3.4	18.7 ± 2.7	ns
1	18.0 ± 3.6	19.3 ± 2.9	ns
5	19.7 ± 3.8	26.0 ± 0.6	ns
25	44.3 ± 10.7	54.3 ± 2.7	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.18. Prima serie di risultati del test di Ames (espressi come colonie/ piastra) eseguito con il ceppo di salmonella TA98 su varie concentrazioni della frazione idrofila dei frutti senza e con S9.

Ames idrofilo TA98 2

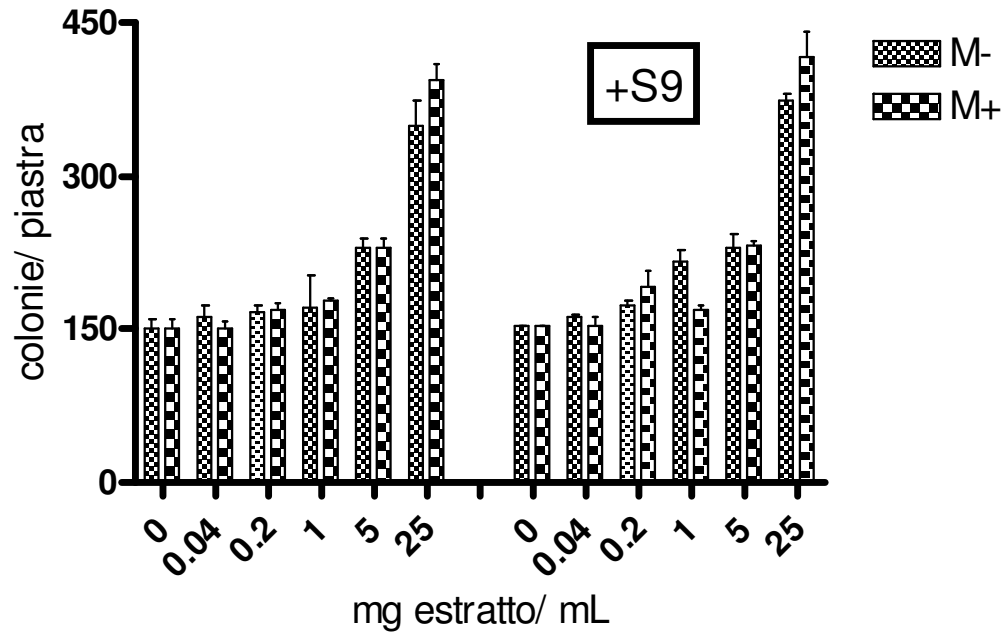


Estratto (mg/ mL)	M- (colonie/ piastra)	M+ (colonie/ piastra)	Significatività
0	20.0 ± 3.8		
0.2	16.3 ± 2.6	17.3 ± 0.9	ns
1	22.0 ± 2.1	20.0 ± 3.5	ns
5	22.3 ± 2.7	31.0 ± 2.6	ns
25	56.3 ± 2.8	56.0 ± 5.3	ns
0	20.0 ± 3.8		
5	24.0 ± 2.6	22.7 ± 1.8	ns
25	55.7 ± 4.1	53.0 ± 3.2	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.19. Seconda serie di risultati del test di Ames (espressi come colonie/ piastra) eseguito con il ceppo di salmonella TA98 su varie concentrazioni della frazione idrofila dei frutti.

Ames idrofilo TA100 1

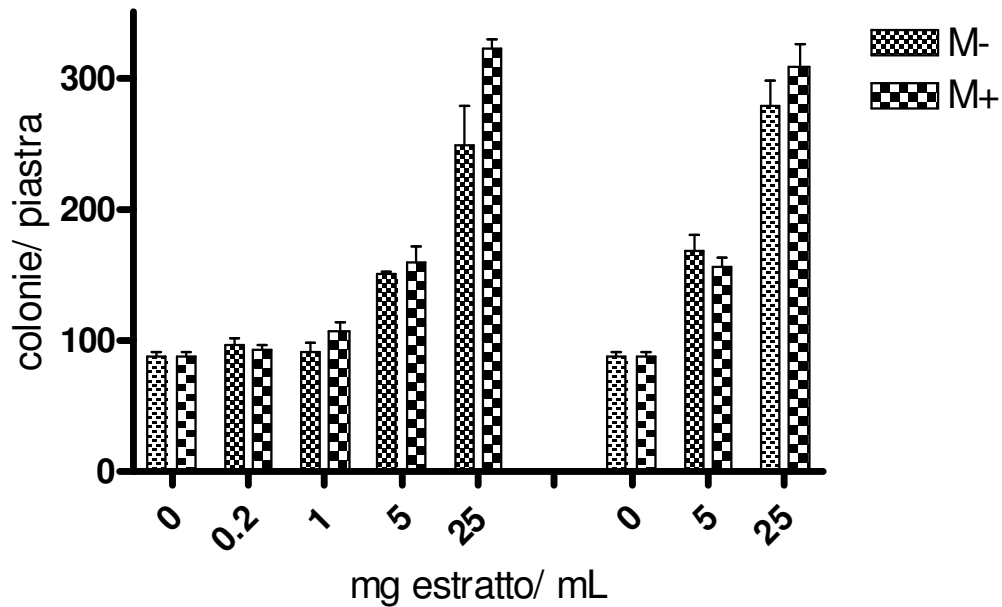


Estratto (mg/ mL)	M- (colonie/ piastra)	M+ (colonie/ piastra)	Significatività
0	151.0 ± 9.2		
0.04	162.0 ± 12.6	150.0 ± 7.3	ns
0.2	167.7 ± 7.0	169.0 ± 6.9	ns
1	171.7 ± 31.5	177.0 ± 4.0	ns
5	229.3 ± 8.9	230.0 ± 8.0	ns
25	349.3 ± 24.0	393.0 ± 17.9	ns
0	153.0 ± 1.2		
0.04	161.3 ± 3.2	152.3 ± 10.5	ns
0.2	174.7 ± 3.0	192.7 ± 14.4	ns
1	215.7 ± 12.6	170.0 ± 3.5	*
5	229.0 ± 13.3	231.0 ± 5.6	ns
25	373.0 ± 8.3	417.7 ± 22.8	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.20. Prima serie di risultati del test di Ames (espressi come colonie/ piastra) eseguito con il ceppo di salmonella TA100 su varie concentrazioni della frazione idrofila dei frutti senza e con S9.

Ames idrofilo TA100 2

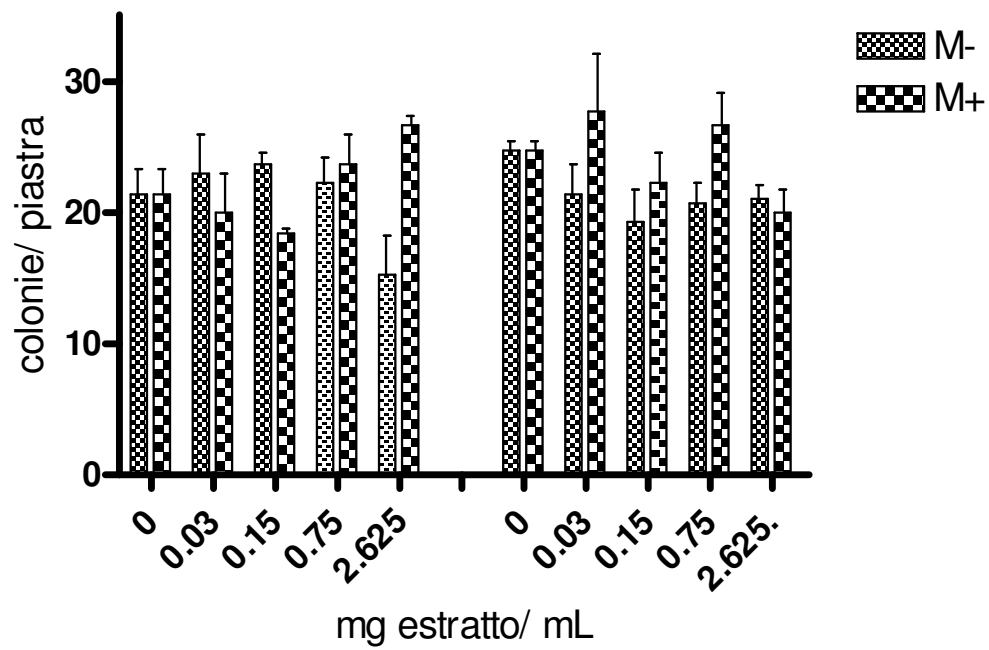


Estratto (mg/ mL)	M- (colonie/ piastra)	M+ (colonie/ piastra)	Significatività
0	88.7 ± 3.2		
0.2	97.0 ± 5.1	93.3 ± 2.6	ns
1	91.3 ± 7.7	107.3 ± 6.7	ns
5	150.0 ± 3.1	160.0 ± 12.5	ns
25	248.3 ± 30.2	322.0 ± 7.5	ns
0	88.7 ± 3.2		
5	168.7 ± 11.4	155.7 ± 6.8	ns
25	279.3 ± 17.6	307.7 ± 18.2	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.21. Seconda serie di risultati del test di Ames (espressi come colonie/ piastra) eseguito con il ceppo di salmonella TA98 su varie concentrazioni della frazione idrofila dei frutti.

Ames lipofilo T A98

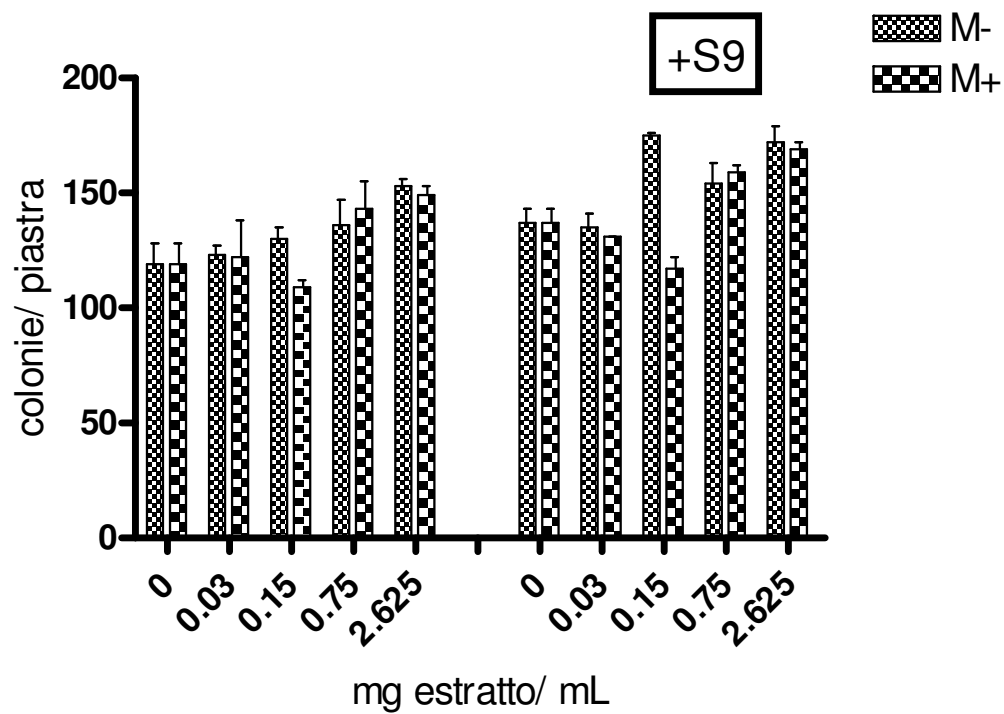


Estratto (mg/ mL)	M- (colonie/ piastra)	M+ (colonie/ piastra)	Significatività
0	21.3 ± 2.0		
0.03	23.0 ± 3.0	20.0 ± 2.9	ns
0.15	23.7 ± 0.9	18.3 ± 0.3	**
0.75	22.3 ± 1.9	23.7 ± 2.3	ns
2.625	15.3 ± 3.0	26.7 ± 0.7	*
0	24.7 ± 0.7		
0.03	21.3 ± 2.3	27.7 ± 4.3	ns
0.15	19.3 ± 2.4	22.3 ± 2.2	ns
0.75	20.7 ± 1.7	26.7 ± 2.4	ns
2.625	21.0 ± 1.2	20.0 ± 1.7	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.22. Risultati del test di Ames (espressi come colonie/ piastra) eseguito con il ceppo di salmonella TA98 su varie concentrazioni della frazione lipofila dei frutti senza e con S9.

Ames lipofilo TA100

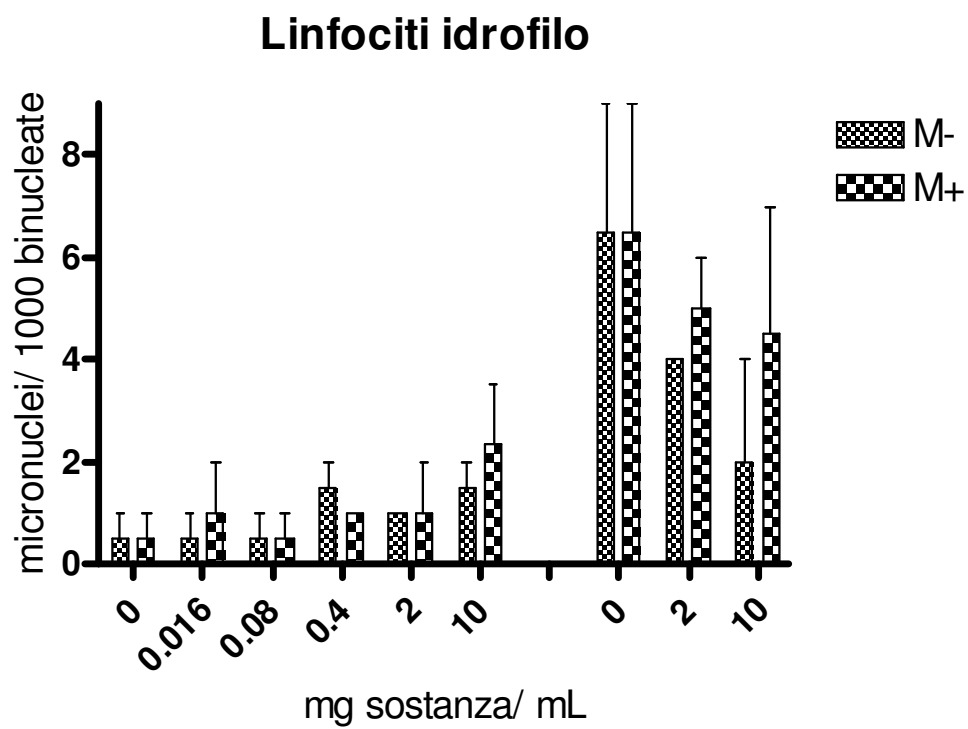


Estratto (mg/ mL)	M- (colonie/ piastra)	M+ (colonie/ piastra)	Significatività
0	119.3 ± 8.9		
0.03	123.0 ± 4.5	122.0 ± 15.9	ns
0.15	130.3 ± 5.2	109.7 ± 2.6	*
0.75	136.3 ± 10.6	143.3 ± 11.8	ns
2.625	153.0 ± 2.9	148.7 ± 4.5	ns
0	136.7 ± 6.0		
0.03	135.3 ± 6.1	131.0 ± 0.6	ns
0.15	175.0 ± 1.2	117.3 ± 4.3	***
0.75	154.0 ± 9.2	159.0 ± 3.5	ns
2.625	172.3 ± 6.6	168.7 ± 3.8	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.23. Risultati del test di Ames (espressi come colonie/ piastra) eseguito con il ceppo di salmonella TA100 su varie concentrazioni della frazione lipofila dei frutti senza e con S9.

Il test con i linfociti non ha rivelato differenze nell'induzione di mutazioni cromosomiche da parte degli estratti dei pomodori di piante micorrizate e non micorrizate (Fig. 4.24 e 4.25).

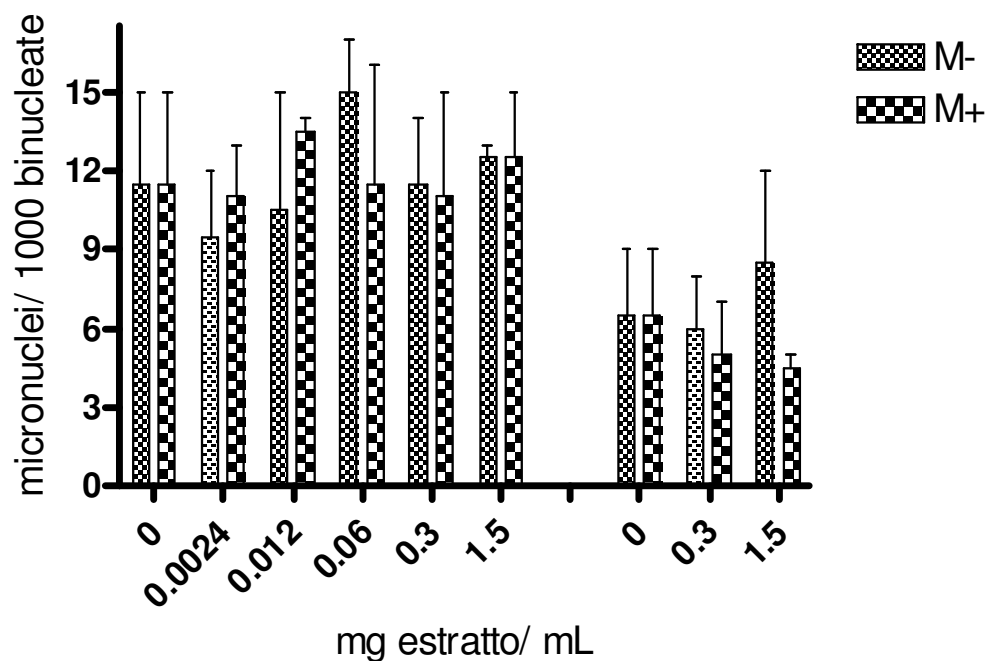


Estratto (mg/ mL)	M- (microN/ 1000biN)	M+ (microN/ 1000biN)	Significatività
0	0.5 ± 0.5		
0.016	0.5 ± 0.5	1.0 ± 1.0	ns
0.08	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	ns
0.4	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.0	ns
2	1.0 ± 0.0	1.0 ± 1.0	ns
10	1.5 ± 0.5	2.3 ± 1.2	ns
0	6.5 ± 2.5		
2	4.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0	ns
10	2.0 ± 2.0	4.5 ± 2.5	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.24. Risultati del test di mutagenesi (espressi come micronuclei/ 1000 binucleate) eseguito con i linfociti su varie concentrazioni della frazione idrofila.

Linfociti lipofilo



Estratto (mg/ mL)	M- (microN/ 1000biN)	M+ (microN/ 1000biN)	Significatività
0	11.5 ± 3.5		
0.0024	9.5 ± 2.5	11.0 ± 2.0	ns
0.012	10.5 ± 4.5	13.5 ± 0.5	ns
0.06	15.0 ± 2.0	11.5 ± 4.5	ns
0.3	11.5 ± 2.5	11.0 ± 4.0	ns
1.5	12.5 ± 0.5	12.5 ± 2.5	ns
0	6.5 ± 2.5		
0.3	6.0 ± 2.0	5.0 ± 2.0	ns
1.5	8.5 ± 3.5	4.5 ± 0.5	ns

ns: non significativo, *: significativo, **: molto significativo, ***: estremamente significativo.

Fig. 4.25. Risultati del test di mutagenesi (espressi come micronuclei/ 1000 binucleate) eseguito con i linfociti su varie concentrazioni della frazione lipofila.

5. DISCUSSIONE

L'impatto della colonizzazione AM e' stata valutata confrontando vari aspetti delle piante micorrizzate (M+) e non micorrizzate (M-) di pomodoro e dei relativi frutti.

Siccome l'intensita' della micorrizzazione nelle piante M+ dipende molto dalle condizioni ambientali e in particolare dalla presenza di P nel terreno (Louis e Lim, 1988; Lu e Koide, 1994), somministrando una bilanciata e abbondante soluzione di nutrienti avremmo corso il rischio di ottenere uno sviluppo micorrizico nullo nelle piante M+ ottenendo performance erroneamente simili nei due tipi di pianta. La disponibilit  delle piante a stabilire un legame simbiotico con funghi AM tende a diminuire quando il nutrimento e' abbondante perch  la simbiosi ha un tale costo energetico per la pianta che questa cerca di evitare la colonizzazione in assenza di reali benefici (Sawers et al, 2007). Dunque sia le piante M- che M+ sono state nutrite con soluzioni minerali carenti in P.

La colonizzazione delle radici nelle piante M+ ha provocato un aumento di volume della parte aerea. Questo dato conferma le due precedenti ricerche di Lu e Koide (1994) e Regvar et al (2003).

Le foglie delle piante non micorrizzate mostrano i sintomi di una carenza. Lo sviluppo vegetativo infatti   scarso e le foglie sono piccole e di colorazione verde pallida tendente al giallo, soprattutto quelle pi  vecchie. Le piante micorrizzate, al contrario, non mostrano alcun sintomo di carenza e hanno un peso secco superiore a quelle non micorrizzate in modo estremamente significativo (Fig. 4.1). L'analisi degli elementi della foglia hanno confermato che le piante non micorrizzate hanno una presenza significativamente minore di alcuni elementi. Le foglie delle piante micorrizzate hanno infatti una concentrazione di P (Fig. 4.4), Zn (Fig. 4.5) e C (Fig. 4.2) significativamente piu' alta rispetto alle piante non micorrizzate. Se consideriamo che la soluzione nutritiva somministrata ai due tipi di pianta era carente in P e che i sintomi da carenza di P sono simili a quelli riscontrati nelle piante non micorrizzate, possiamo affermare che lo stato di stress delle piante non micorrizzate sia dovuto a una carenza di P. Le piante micorrizzate non sono andate incontro alla stessa patologia probabilmente perch  le ife extraradicali si estendono nel terreno pi  abbondantemente e velocemente delle

radici riuscendo ad assorbire il P da zone più ricche. Inoltre i funghi micorrizici influenzano le proprietà fisico-chimiche del terreno contribuendo al rilascio di P da complessi inorganici poco solubili (Finlay, 2008; Parniske, 2008). Così come la micorrizazione produce incrementi di crescita simili a quelli del P aggiunto (Giovanetti e Avio, 2002; Smith e Read, 1997), in questo caso potrebbe aver sopperito a una situazione di carenza. Una concentrazione superiore di P nella parte aerea delle piante micorrizzate è confermata da molte ricerche (Cui e Nobel, 1992; Wright et al 1998b; Elke e Eckhard, 2005; Cavagnaro et al, 2006).

Il C è l'elemento di gran lunga più presente nelle piante. Dalla quantificazione degli elementi eseguita per questo lavoro risulta che il peso del C contenuto nelle foglie è 10 volte superiore al secondo elemento più rappresentato, il Ca (Fig. 4.1 e 4.2). La quantità in peso di tutti gli altri elementi inoltre, scende al punto che possiamo considerare il contenuto di C come principale fattore nella determinazione del peso secco delle foglie. La sua significativa maggior presenza nelle foglie delle piante micorrizzate (Fig. 4.1) potrebbe dunque essere la causa dell'aumento del peso secco della parte aerea delle piante micorrizzate. Un aumento del peso secco delle piante micorrizzate trova riscontro anche in letteratura con le ricerche di Subramanian et al. (2005) e Cavagnaro et al. (2006).

L'incremento estremamente significativo nella concentrazione di Zn nei tessuti delle foglie delle piante micorrizzate (Fig. 4.5) conferma i risultati di diverse precedenti ricerche (Cui e Nobel, 1992; Elke e Eckhard, 2005; Cavagnaro et al, 2006). Uno studio di Marschner e Dell (1994) ha calcolato che il 25% dell'assorbimento di Zn da parte delle piante può essere fornito dalle micorrize.

Le foglie delle piante micorrizzate presentano anche una maggiore quantità di N, anche se in modo poco significativo (Fig. 4.3). Un maggior contenuto di N nella parte aerea dovuto alla micorrizazione era già stato riscontrato nelle ricerche di Wright et al (1998b), Subramanian et al (2005) e Cavagnaro et al (2006). La spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere una maggior disponibilità di N nel terreno delle piante micorrizzate. I funghi micorrizici arbuscolari infatti possono

accelerare la decomposizione di materiale organico e assorbire l'N che ne deriva (Hodge et al, 2001).

Al contrario le piante micorrizate hanno un contenuto nettamente inferiore di Fe, Mn (Fig. 4.5), Ca (Fig. 4.3), Mg e Na (Fig. 4.4).

La diminuzione di Mn e Fe (Fig. 4.5) nella parte aerea delle piante micorrizate è già conosciuta in letteratura, grazie ai lavori di Arines et al (1989), Kothari et al (1991), Marschner (1995) per quanto riguarda il Mn e grazie a Nogueira et al (2007) che recentemente hanno quantificato la presenza di entrambi gli elementi in piante micorrizate e non. Secondo questa ricerca è curioso notare che la solubilità sia del Mn che del Fe aumenta a opera dei batteri Mn-riduttori selezionati dai funghi AM. Le micorrize dunque metterebbero in atto sistemi non ancora conosciuti con l'obiettivo di limitare l'assorbimento di questi metalli. Questi meccanismi sarebbero così efficienti che le piante micorrizate possono sopportare meglio di quelle senza micorrizzazione un inquinamento da metalli. Nogueira et al (2007) ipotizzano che un'alta concentrazione di P tipica delle piante micorrizate aiuterebbe la detossificazione da questi elementi. La pianta micorrizata verrebbe protetta da un eccessivo assorbimento di metalli anche dalla glomalina, una particolare proteina secreta in abbondanza nella rizosfera dai funghi AM. Sembra infatti che questa crei dei legami molto stabili con i metalli e, grazie alla sua lipofilia, il costrutto glomalina-metallo rimarrebbe edeso alle parti solide del terreno rendendo la soluzione circolante povera di metalli (Gonzales-Chevez et al, 2004).

Anche il minor contenuto di Mg delle piante micorrizate rispetto a quelle prive di simbiosi AM (Fig. 4.4) è una conferma ai lavori precedenti. Cavagnaro et al (2006) hanno analizzato il contenuto di elementi in mutanti di pomodoro difettivi nella capacità di stabilire simbiosi micorriziche e il loro progenitore non mutato rilevando una diminuzione nella parte aerea di Mg e Na. Non è stata però ancora trovata una spiegazione a questo comportamento. Cavagnaro et al (2006) avanzano l'ipotesi che l'assorbimento del Mg venga inibito competitivamente da alti cationi del suolo come K, Ca e Mn.

La diminuzione nel contenuto di Na delle piante micorrizate è invece in contrasto con il lavoro di Cavagnaro et al (2006) che invece dimostra un aumento di questo elemento nei tessuti delle piante simbiotiche.

Riguardo la concentrazione di K e S non sussiste una differenza significativa nella concentrazione di questi elementi nella parte aerea delle piante micorrizate e non (Fig. 4.3 e 4.4).

Per quanto riguarda i frutti, il calibro e il peso fresco sono maggiori nei frutti micorrizzati in modo molto significativo (Fig. 4.6).

Per quanto riguarda il peso secco non ci sono differenze significative nei due tipi di frutto (Fig. 4.6).

Come constatato nella parte aerea, anche per frutti la micorrizzazione provoca un netto aumento nella concentrazione di P (Fig. 4.9). La concentrazione di P nei frutti di piante micorrizate arriva a essere 1,6 volte quelle dei frutti delle piante senza micorrizzazione. Questa notevole differenza è stata riscontrata anche nella ricerca di Cavagnaro et al (2006).

Come la parte aerea anche il frutto delle piante micorrizate vede aumentare il contenuto di Zn in modo significativo (Fig. 4.10). Anche questo dato è in accordo con il lavoro di Cavagnaro et al (2006), in cui questo dato viene commentato come importante per la qualità nutrizionale dei frutti in quanto spesso lo Zn è spesso coinvolto nelle deficienze nutrizionali minerali (Welch e Graham, 2004).

Contrariamente a quanto avviene per la parte aerea anche la concentrazione di Ca nei frutti aumenta con la micorrizzazione (Fig. 4.9). Lo stesso avviene per il K (Fig. 4.8) che invece non subiva sostanziali cambiamenti di concentrazione fra i due tipi di pianta nei tessuti della parte aerea (Fig. 4.3).

La concentrazione di S nei frutti invece diminuisce con la micorrizzazione (Fig. 4.9) contrariamente alla parte aerea in cui restava invariata (Fig. 4.4).

La concentrazione di Na nei frutti dei due tipi di pianta non risulta avere differenze significative (Fig. 4.9). Questo dato non è in accordo con la ricerca di Cavagnaro et al (2006) che invece vede un aumento di questo elemento (Regvar et al, 2003) nei frutti di piante non micorrizate.

Per quanto riguarda gli elementi C (Fig. 4.7), N (Fig. 4.8), Mg, Na (Fig. 4.9), Fe e Mn (Fig. 4.10) non si rilevano differenze nei due tipi di frutto.

I pH dei due tipi di frutto non hanno differenze significative, prova che la maturità dei frutti alla raccolta è abbastanza simile (Fig. 4.11). La quantità di solidi solubili invece è significativamente superiore nei frutti delle piante micorrizate, così come l'acidità titolabile (Fig. 4.11). Quest'ultimo dato è in disaccordo con quello di Cavagnaro et al (2006) che vede per i frutti delle piante micorrizate un'acidità titolabile superiore.

Per quanto riguarda i composti secondari delle piante, i risultati di questo lavoro dimostrano che la micorrizzazione provoca un significativo aumento nel contenuto di licopene nei frutti (Fig. 4.12). Alla stessa conclusione era giunta la ricerca di Regvar et al (2003).

Quanto al contenuto di polifenoli totali (Fig. 4.13), acido ascorbico ridotto e ossidato (Fig. 4.14) e glutathione ridotto e ossidato (Fig. 4.15) non sussistono differenze significative tra i frutti dei due tipi di pianta.

Le frazioni idrofile dei due frutti hanno una capacità di neutralizzare il radicale ABTS^{•+} simile (Fig. 4.16) mentre la frazione lipofila dei pomodori di piante non micorrizate ha una capacità antiossidante leggermente superiore a quella di pomodori di piante micorrizate (Fig. 4.17).

Esaminando la tendenza a provocare mutazioni puntiformi degli estratti, i risultati del test di Ames non mostrano differenze significative. Gli unici casi in cui si notano differenze sono nella prima serie di test eseguiti con il ceppo di salmonella TA100 con S9 sulla frazione idrofila alla concentrazione di 1 mg/ mL (Fig. 4.20), nei test eseguiti con il ceppo TA98 sulla frazione lipofila alla concentrazione di 0.15 e 2.625 mg/ mL (Fig. 4.22), nei test eseguiti con il ceppo TA100 sulla frazione lipofila alla concentrazione di 0.15 mg/ mL con e senza S9 (Fig. 4.23). Siccome tuttavia alle dosi massime di estratto non si sono notate differenze nell'induzione di mutagenesi possiamo considerare queste differenze non significative. E' interessante notare che le dosi massime degli estratti idrofili dei frutti di piante sia micorrizate che non provocano mutazioni revertenti in entrambi i ceppi di salmonella, anche con aggiunta di S9mix (Fig. 4.18, 4.19,

4.20 e 4.21). Una spiegazione di questo fenomeno potrebbe essere il fatto che una componente molto rappresentata e biologicamente attiva nella frazione idrofila dei frutti è costituita dai polifenoli. Si sa che i polifenoli agiscono da antiossidanti grazie al loro potenziale riduttivo. Ma molti studi condotti in vitro hanno dimostrato che alte concentrazioni di polifenoli risultano mutagene (Delaney et al. 2002; Harwood et al. 2007; Fujii et al. 2008). Non è stato definitivamente stabilito il motivo di questo comportamento. Alcuni ipotizzano che l'effetto di ossidazioni enzimatiche e chimiche renda queste molecole attive verso il DNA, altri attribuiscono il potere mutageno di alte concentrazioni di polifenoli al fatto che riducono l'ambiente o l'ossigeno disciolto a H_2O_2 . Ma nessuna attività cancerogena è stata osservata negli studi in vivo (Rietjens et al. 2005; Takumi-Kobayashi et al. 2008). Utilizzando un microscopio si può osservare il tappeto di crescita batterico, l'insieme delle numerose piccole colonie di batteri non reverenti che si sono potute sviluppare grazie alla, seppur limitata, istidina presente nell'agar. Un tappeto di crescita scarso è indice di un'alta tossicità della sostanza testata. Tutte le piastre del presente lavoro hanno un buon terreno di crescita, anche alle concentrazioni massime. Dunque possiamo pensare che gli estratti idrofili e lipofili sia delle piante micorrizate che non micorrizate non abbiano una tossicità particolarmente alta.

Il test con i linfociti non ha rivelato differenze nell'induzione di mutazioni cromosomiche da parte degli estratti dei pomodori di piante micorrizate e non micorrizate (Fig. 4.24 e 4.25). La concentrazione degli estratti utilizzati in questo tipo di test tuttavia sono state molto più basse di quelle utilizzate nel test di Ames. Dunque non sappiamo se utilizzando le stesse dosi avremmo ottenuto una pari risposta positiva per la mutagenicità cromosomica e se ci sarebbero state differenze fra i due tipi di pomodoro. Lo stato delle ricerche in questo campo, tuttavia, ci suggerisce che i polifenoli ad alte concentrazioni hanno potere mutageno anche cromosomicamente nei test in vitro (Delaney et al. 2002; Harwood et al. 2007; Fujii et al. 2008)

In conclusione possiamo sostenere che il consumo di pomodori derivanti da piante micorrizzate e' mutagenicamente sicuro quanto quello di pomodori di piante non micorrizzate.

BIBLIOGRAFIA

Adsule PG, Dan A (1979). Simplified extraction procedure in the rapid spectrophotometric method for lycopene estimation in tomato. *Journal of Food Science & Technology* 16: 216–216.

Akiyama K, Hayashi H (2002). Arbuscular mycorrhizal fungus promoted accumulation of two new terpenoid in cucumber roots. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 762-769.

Anderson ME (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 113: 548-555.

Andrade G, Azcon R, Bethlenfalvay GJ (1995). A rhizobacterium modifies plant and soil responses to the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied Soil Ecology* 2, 195–202.

Arines J, Vilarino A, Sainz M. (1989). Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pretense* L.) plants regenerated from selected cell cultures. *Soil Sci Plant Nutr.* 37: 699-705.

Bago B., Azcon-Aguilar C., Goulet A., Piche L. (1998). Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 139:375-388.

Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y (2002). Translocation and utilization of fungal storage lipid in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 128: 108-124.

Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Shachar-Hill Y (2003). Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant physiol.* 131: 1496-1507.

Basaglia M. et al. (2006). *Microorganismi benefici per le piante*. Edizioni Idelson-Gnocchi. pp. 1-208.

Beerh OP, Siddappa GS (1959). A rapid spectrophotometric method for the detection and estimation of adulterants in tomato ketchup. *Food Technology* 13: 414–418.

Benhamou TM (1996). Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* 1: 233-240.

Bever JD, Morton JB, Antonovics J, Schultz PA (1996). Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in mown grassland. *Journal of Ecology* 84, 71-82.

Bezemer TM, Van Dam NM (2005). Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends Ecol Evol.* 20: 617-624.

Bianciotto V, Bandi C, Minerdi D, Sironi M, Tichy HV, Bonfante P (1996). An obligately endosymbiotic mycorrhizal fungus itself harbors obligately intracellular bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3005–3010.

Bianciotto V, Bonfante P (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 81, 365-371.

Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P, Vandamme P (2003). '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' *gen. nov., sp nov.*, an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 121–124.

Boddington CL, Dodd JC (2000). The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. I. Field studies in an Indonesian ultisol. *Plant and Soil* 218, 137-144.

Bonfante P, Perotto S (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130: 3-21.

Bonfante P, Anca IU. (2009). Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Rev Microbiol.* 63: 363-383.

Brehe JE, Burch HB (1976). Enzymatic assay for glutathione. *Analytical Biochemistry* 74: 189-197.

Bucher M. (2007). Functional biology of of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* 173: 11-26.

Budi SW, van Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S (1999). Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium compatible with arbuscular mycorrhiza development and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5148-5150.

Burleigh SH, Cavagnaro TR, Jakobsen I (2002). Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to expression of plant genes involved in P nutrition. *J Exp Bot.* 53: 1-9.

Cabras P, Martelli A (2004). *Chimica degli alimenti*. Piccin. 257-277.

Cano A, Acosta M, Arnao MB (2003). Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Postharvest Biology and Technology* 28: 59-65.

Cànovas FM, Dumas-Gaudot E, Recorbet G, Jorin J, Mock HP, Rossignol M (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*. 4: 285-298.

Cavagnaro TR, Jackson LE, Six J, Ferris H, Goyal S, Asami, D, Scow KM. (2006). Arbuscular mycorrhizas, microbial communities, nutrient availability, and soil aggregates in organic tomato production. *Plant and soil*. 282: 209-225.

Chiariello N., Hickman J.C., Mooney H.A. (1982). Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorus in a community of annual plants *Plantago erecta*. *Science*. 217: 941-943.

Citernesi AS, Fortuna P, Filippi C, Bagnoli G, Giovannetti M (1996). The occurrence of antagonistic bacteria in *Glomus mosseae* pot cultures. *Agronomie* 16, 671-677.

Cooper K.M., Tinker P.B. (1978). Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. II. Uptake and translocation of phosphorus, zinc and sulphur. *New Phytol.* 81: 43-52.

Copetta A, Lingua G, Berta G (2006). Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L var. Genovese. *Mycorrhiza*. 16: 485-494.

Cordier C, Pozo MJ, Barea JM, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1998). Cell defence response associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant Microbe Interact.* 11: 1017-1028.

Costato L (2007). *Compendio di diritto alimentare*. Casa editrice dott. Antonio Milani. 236-241.

Cruz C, Egsgaard H, Trujillo C, Ambus P, Requena N, Martins-Loução MA, Jakobsen I (2007). Enzymatic evidence of the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant physiol.* 144: 782-792.

Cui M, Nobel PS (1992). Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 122: 643-649.

Declerck S, Strullu DG, Fortin JA, Ed EDS (2005). *In vitro culture of mycorrhizas*. Soil biology. Springer, Berlin.

Delaney B, Phillips K, Vasquez C, Wilson A, Cox D, Wang H-B, Manthey J (2002). Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food and Chemical Toxicology*. 40: 617-624.

Dodd, J.C. 2000. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro-and natural ecosystems. *Out look on Agriculture* 29, 55-62.

Dotzler N, Krings M, Taylor TN, Agerer R (2006). Germination shields in *Scutellospora* (Glomeromycota: Diversisporales, Gigasporaceae) from the 400 million-year-old Rhynie chert. *Mycol. Prog.* 5: 178-184.

Duan X, Neuman DS, Reiber JM, Green CD, Saxston AM, Augè RM (1996). Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany*. Vol.47 No. 303. 1541-1550.

Elke N, Eckhard G (2005). Does the presence of arbuscular mycorrhizal fungi influence growth and nutrient uptake of a wild-type tomato cultivar and a mycorrhiza-defective mutant, cultivated with roots sharing the same soil volume? *New Phytologist*. 166: 601-609.

Eom AH, Hartnett DC, Wilson GWT (2000). Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal communities in tallgrass prairie. *Oecologia* 122, 435-444.

Eskin NAM (1991). Quality and preservation of fruits. CRC Press. Boca Raton. FL.

Filippi C, Bagnoli G, Citernes AS, Giovannetti M (1998). Ultrastructural spatial distribution of bacteria associated with sporocarps of *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 24, 1-12.

Finlay R.D. (2008). Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J. Exp. Bot.* 59: 1115-1126.

Fitter AH (1985). Functioning of vesicular-arbuscular mycorrhizas under field conditions. *New Phytol.* 99: 257-265.

Food and Drug Administration (2005). Guide to produce farm investigation.

Francis R., Read D.J. (1984). Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature.* 307: 53-56.

Francis R., Finlay R.D., Read D.J. (1986). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in inter- and intra-specific combinations of host plants. *New Phytol.* 102: 103-111.

Frank, B. 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 3, 128-145.

Fujii H, Nishioka H, Wakame K, Magnuson BA, Roberts A (2008). Acute, subchronic and genotoxicity studies conducted with Oligonol, an oligomerized polyphenol formulated from lychee and green tea extracts. *Food and Chemical Toxicology.* 46: 3553-3562.

Galli Volonterio A (2005). *Microbiologia degli alimenti*. Casa editrice Ambrosiana. 87-117.

Garcia-Garrido JM, Ocampo JA (2002). Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Exp Bot.* 53: 1377-1386.

Gillespie KM, Ainsworth L (2007). Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plant. *Nature Protocol* 2: 871-874.

Giovannetti M., Citernesi A.S. (1993). Time-course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*. 97: 1140-1142.

Giovannetti M. (2000). Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth in arbuscular mycorrhizae: physiology and function. Kluwer academic publishers. Dordrecht, 47-78.

Giovannetti M., Avio L. (2002). Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. *Agriculture and Food Production*. 2: 275-310.

Giovannetti M. (2006). I funghi micorrizici arbuscolari come biofertilizzanti. Edizioni Idelson-Gnocchi. Cap. 7. pp. 126-142.

Gonzales-Chavez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA (2004). The rôle of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environmental Pollution*. 130: 317-323.

Govindalajulu M, Pfeffer PE, Jin H, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bücking H, Shachar-Hill Y (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435: 819-823.

Grandmaison J, Olah GM, Vancalsteren MR, Furlan V (1993). Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza*. 3: 155-164.

Griffith OW (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry* 106: 207-212.

Habbott L.K., Robson A.D. (1994). The effect of VA mycorrhizae on plant growth. VA Mycorrhiza (Eds. Powell C.L., Bagyaraj D.J.). CRC Press, Boca Raton, 113-130.

Harrier LA, Watson CA (2004). The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and-or other sustainable farming system. Pest Manag Sci. 60: 149-157.

Harris D, Paul EA (1987). Carbon requirement of vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: Ecophysiology of Vamycorrhizal plants. CRC, Boca Raton, FL, 93-105.

Harrison M., Van Buren M. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. Nature. 378: 626-629.

Harrison MJ (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annu. Rev. Microbiol. 59: 19-42.

Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. Food and Chemical Toxicology. 45: 2179-2205.

Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JP (1998). Ploughing up the wood-wide web? Nature. 6692: 394-431.

Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, Luecking R (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research. 111: 509-547.

Hildebrandt U, Janetta K, Bothe H (2002). Towards growth of arbuscular mycorrhizal fungi independent of a plant host. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1919-1924.

Hodge A., Campbell C.D., Fitter A.H. (2001). An arbuscular mycorrhizal fungus accelerate decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. *Nature*. 413: 297-299.

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Vilgalys R (2006). Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature*. 443: 818–822.

Javot H., Pumplin N., Harrison M.J. (2007). Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* 30: 310-322.

Jeffries, P., Gianinazzi, S., Perotto, S., Turnau, K. & Barea. J-M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37, 1-16.

Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES (1994). Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. *Plant Soil*. 160: 1-9.

Jones CG, Last FT (1991). In: Barbosa P, Krischik VA, Jones CG (eds). *Microbial mediations of plant-herbivore interactions*. Wiley, New York. 65-103.

Kader AA (1992). *Postharvest technology of horticultural crops*. 2nd edn. University of California division of agriculture and natural resources. Publication 3311.

Kader AA, Barrett DM (1996). Classification, composition of fruits, and postharvest maintenance of quality, in Processing Fruits. Science and Technology. Vol I. Technomic Publishing Co. Lancaster. 1-24.

Kader AA (2002). Fruits in the global market. Fruit quality and its biological basis. Edited by Knee M. Casa ed. CRC Press. 1-16.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inzé D (1995). Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue – *Analytical Biochemistry* 225: 165-167.

Khaosaad T, Vierheilig H, Nell M, Zitterl-Egelseer K, Novak J (2006). Arbuscular mycorrhiza alter the concentration of essential oils in oregano (*Origanum* sp., Lamiaceae). *Mycorrhiza*. 16: 443-446.

Klironomos JN, McKune J, Hart M, Neville J (2000). The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationships between plant diversity and productivity. *Ecol. Lett.* 3: 137-141.

Kothari SK, Marschner H, Romheld V. (1991). Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere microorganisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize.(*Zea mays* L). *New Phytol.* 117: 649-655.

Lamb C, Dixon RA. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 48: 251-275.

Lambais MR, Mehdy MC. (1995). Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Canadian Journal of Botany.* 73: S533-S540.

Lambais MR, Rios-Ruiz W, Andrade RM. (2003). Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 160: 421-428.

Larose G, Chenevert R, Moutoglis P, Gagne' S, Piche' Y, Vierheilig H (2002). Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the symbiosis and the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J Plant Physiol*. 159: 1329-1339.

Lea AGH (1992). *Plant Polyphenol*. Hemingway Ed.

Levy Y, Syvertsen JP, Nemec S (1982). Effect of drought stress and arbuscular mycorrhiza on citrus transpiration and hydraulic conductivity of roots. *New Phytologist*. Vol 93. 1: 61-66.

Logi C., Sbrana C., Giovannetti M. (1998). Cellular events involved in survival of individual arbuscular mycorrhizal symbionts growing in the absence of the host. *Applied Environmental Microbiology*. 64: 3473-3479.

Louis I, Lim G (1988). Differential response in growth and mycorrhizal colonisation of soybean to inoculation with two isolates of *Glomus clarum* in soils of different P availability. *Plant and Soil*. Vol.112. 1: 37-43.

Lu X, Koide RT (1994). The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. *New Phytol*. 128: 211-218.

Mader P., Edenhofer S., Boller T., Wiemkem A., Niggli U. (2000). Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biol. Fert. Soils*. 31: 150-156.

Maldonado-Mendoza E.G., Dewbre G.R., Harrison M.J. (2001). A phosphate transporter gene from the extraradical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1140-1148.

Marschner H, Dell B (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil.* 159: 89-102.

Marschner H (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd Ed. Academic Press Ltd, San Diego, CA.

Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M (2006). *Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring* – *Biochimie* 88: 1515-1535.

Mayo K, Davis RE, Motta J (1986). Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia* 78, 426-431.

McClain RM, Bausch J (2003). Summary of safety studies conducted with synthetic lycopene. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 37: 274-285.

Morandi D (1996). Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. Vol. 185. 2:241-251.

Mortelmans K, Zeiger E (2000). *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay* – *Mutation Research* 455: 29–60.

Mosse B (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal of General Microbiology* 27, 509-520.

Nogueira MA, Nehls U, Hampp R, Poralla K, Cardoso EJBN. (2007). Mycorrhiza and soil bacteria influence extractable iron and manganese in soil and uptake by soybean. *Plant Soil*. 298: 273-284.

Olsson PA, Jakobsen I, Wallander H (2002). Foraging and resource allocation strategies of mycorrhizal fungi in a patchy environment. *Ecol Stud*. 157: 93-115.

Parniske M. (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews*. 6: 763-775.

Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2004). Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. *J Exp Bot*. 55: 1743-1750.

Prior RL, Cao G (2000). Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: diet and health implications. *Hort Science*. 35: 588-592.

Rabin LB, Pacovsky RS (1985). Reduced larva growth of two Lepidoptera (Noctuidae) on excised larvae of soybean infected with a mycorrhizal fungus. *J Econ Entomol*. 78: 1358-1363.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26: 1231-1237.

Regvar M, Vogel-Mikus K, Severkar T (2003). Effect of AMF inoculum from field isolates on the yield of green pepper, parsley, carrot, and tomato. *Folia Geobotanica*. 38: 223-234.

Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11841-43.

Rhodes L.H., Gerdemann J.W. (1978). Hyphal translocation and uptake of sulphur by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Soil Biol. Biochem.* 10: 355-360.

Ribèreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D (1998). *Trattato di enologia II*. Edagricole.

Rietjens IMCM, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SMF, Schutte ME, Alink GM (2005). Flavonoids and alkenylbenzenes: Mechanisms of mutagenic actions and carcinogenic action and carcinogenic risk. *Mutation Research.* 574: 124-138.

Robertson GP, Klingensmith KM, Klug MJ, Paul EA, Crum JR, Ellis BG (1997). Soil resources microbial activity, and primary production across an agricultural ecosystem. *Ecol Appl.* 7: 158-170.

Roesti D, Ineichen K, Braissant O, Redecker D, Wiemken A, Aragno M (2005). Bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6673-6679.

Ruiz-Lozano JM, Azcón R (1995). Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum.* Vol 95. 3: 472-478.

Ruiz-Lozano JM (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza.* 13: 309-317.

Sacchetti G (2003). Influenza delle caratteristiche compositive sulle proprietà sensoriali e salutistiche dei prodotti frutticoli: studio su prodotti freschi e trasformati. Tesi di Dottorato in Scienze degli Alimenti, Università di Bologna.

Sanders FE, Tinker PB (1971). Mechanism of absorption of phosphate from soil by *Endogone mycorrhizas*. *Nature*. 233: 278-279.

Sanders IR, Fitter AH (1992). Evidence for differential responses between host-fungus combinations of vesicular-arbuscular mycorrhizas from grassland. *Mycological Research* 96, 415-419.

Sawers RJH, Gutjahr C, Paszkowski U (2007). Cereal mycorrhiza: an ancient symbiosis in modern agriculture. 93-97.

Scharff AM, Jakobsen I, Rosendahl L (1997). The effect of symbiotic microorganisms on phytoalexin content of soybean roots. *J Plant Physiol*. 151: 716-723.

Schützendübel A, Polle A (2002). Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. 53: 1351-1365.

Secilia J, Bagyaraj DJ (1987). Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Canadian Journal of Botany* 33, 1069-1073.

Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA (1993). Biochemistry of fruit ripening. Chapman & Hall. London.

Shewfelt RL (1999). What is quality? *Postharvest Biology and Technology*. 15: 197-200.

Sieverding E, Oehl F (2006). Revision of *Entrophospora* and description of *Kuklospora* and *Intraspora*, two new genera in the arbuscular mycorrhizal Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 80, 69-81.

Singh DP, Srivastava JS, Bahadur A, Singh UP, Singh SK (2004). Arbuscular mycorrhizal fungi induced biochemical changes in pea (*Pisum sativum*) and their effect on powdery mildew (*Erysiphe pisi*). *Journal of Plant Disease and Protection*. 111: 266-272.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.

Sirohi SS, Singh OS (1983). Relationship of endomycorrhizal association of unsterilized soils with available soil phosphorus, plant growth, phosphorus uptake and soil synthesis in peppermint. *Sci Hortic*. 20: 185-191.

Southon S (2000). Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. *Food Research International*. 33: 211-217.

Smith S.E. (1982). Inflow of phosphate into mycorrhizal and non mycorrhizal *Trifolium subterraneum* at different levels of soil phosphate. *New Phytol*. 90: 293-303.

Smith S.E., Read D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd edn. Academic Press, London. 1-605.

Smith KP, Goodman RM (1999). Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology* 37, 473-491.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133: 16-20.

Snowdon AL (1990). A color atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol I. General introduction and fruits. CRC Press. Boca Raton. FL.

St John TV, Coleman DC, Reid CPP (1983). Growth and spatial distribution of nutrient absorbing organs, selective exploitation of soil heterogeneity. *Plant and soil.* 71: 487-493.

Subramanian KS, Santhanakrishnan P, Balasubramanian P (2005). Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhizal fungal colonization under varying intensities of drought stress. *Scientia Horticulturae.* Vol 107. 3: 245-253.

Takumi-Kobayashi A, Ogura R, Morita O, Nishijama N, Kasumatsu T (2008). Involvement of hydrogen peroxide in chromosomal aberrations induced by green tea catechins in vitro and implications for risk assesment. *Mutation Research.* 657: 13-18.

Tibbett M (2000). Roots, foraging and the exploitation of soil nutrient patches, the roles of mycorrhizal symbiosis. *Funct Ecol.* 14: 397-399.

Toljander JF, Artursson V, Paul LR, Jansson JK, Finlay RD (2006). Attachment of different soil bacteria to arbuscular mycorrhizal fungal extraradical hyphae is determined by hyphal vitality and fungal species. *FEMS letters* 254 (1), 34-40.

Tomas-Barberan EA, Robins RJ (eds) (1997). *Phytochemistry of Fruits and Vegetables.* Oxford Science. Oxford.

Toro M, Nedialkova K, Azcon R, Barea JM (1996). Establishment of two rock phosphate solubilizing bacteria in the rhizosphere of mycorrhizal onion plants and their effect on plant growth in a microcosm. In *Mycorrhizas in Integrated Systems: From Genes to Plant Development (EUR 16728)*. Edited by C. Azcon-Aguilar & J. M. Barea. European Commission, Luxembourg, Luxembourg. 665-668. pp.

Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C (2004). Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in a vitro compartmented system. *Can J Microbiol.* 50: 251-260.

Toussaint JP (2007). Investigating physiological changes in the aerial parts of AM plants: what do we know and where should we heading? *Mycorrhiza*. 17: 349-353.

Toussaint JP, Kraml M, Nell M, Smith SE, Smith FA, Steinkellner S, Schmiderer C, Vierheilig H, Novak J (2008). Effect of *Glomus mosseae* on concentrations of rosmarinic and caffeic acids and essential oil compounds in basil inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *basilici*. *Plant Pathology*. 57: 1109-1116.

VanEtten HD, Mansfield JW, Bailey JA, Farmer JA (1994). Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoanticipins". *Plant Cell*. 6: 1191-1192.

Von Alten H, Lindermann A, Schonbeck F (1993). Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza by fungicides or rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* 2, 167–173.

Walley FL, Germida JJ (1996). Failure to decontaminate *Glomus clarum* NT4 spores is due to spore wall-associated bacteria. *Mycorrhiza* 6, 43-49.

Wargovich MJ (2000). Anticancer properties of fruits and vegetables. *Hort Science*. 35: 573-575.

Welch RM, Graham RD. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J Exp Bot*. 55: 353-364.

White P.J., Broadley M.R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci*. 10 : 586-593.

Wright DP, Read DJ, Scholes JD (1998a). Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ*. 21: 881-891.

Wright DP, Scholes JD, Read DJ (1998b). Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ*. 21: 209-216.

Xavier LJC, Germida JJ (2003). Bacteria associated with *Glomus clarum* spores influence mycorrhizal activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 471–478.

Xinhua H., Kazuhide N. (2007). Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition? *Trends in Plant Science*. Vol.12,No.8: 331-333.

Zhu Y-G, Christie P, Laidlaw AS (2001). Uptake of Zn by arbuscular mycorrhizal white clover from Zn-contaminated soil. *Chemosphere*. 42: 193-199.